
AGRIC.
LIBRARY



Beiträge zu bisher bekannten Reaktionen zur Unterscheidung von roher und erhitzter Milch mit besonderer Berücksichtigung der Guajakproben.

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

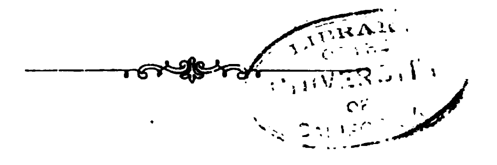
Erlangung der Doktorwürde

der

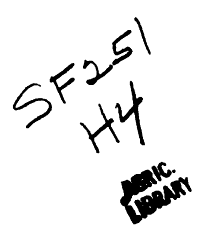
philosophischen Fakultät der Albertus-Universität zu Königsberg i. Pr.

vorgelegt von

Bruno Herholz
aus Kossen, Kreis Heilsberg, Ostpr.



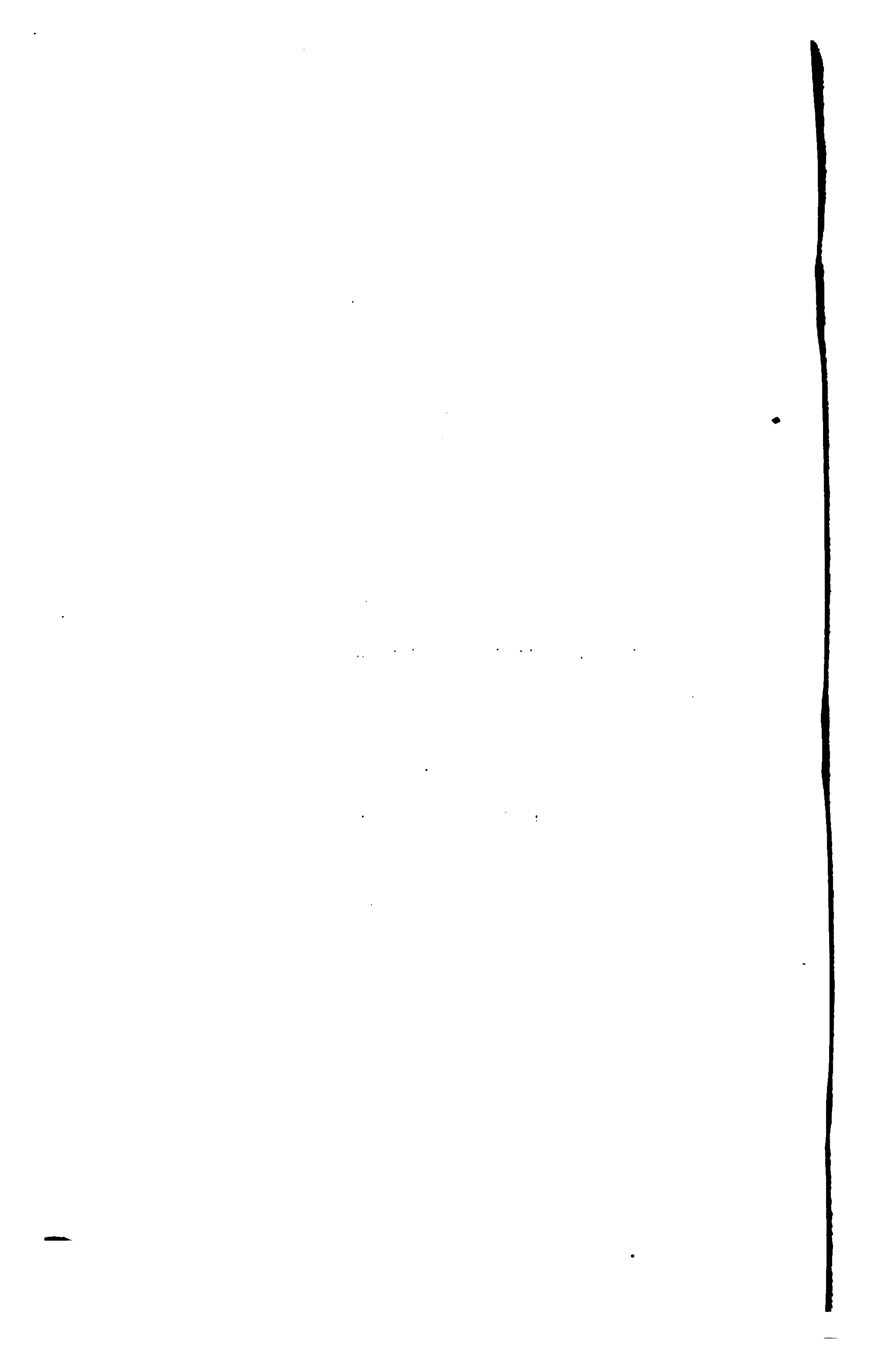
Braunsberg 1908.
Ermländische Zeitungs- und Verlagsdruckerei.



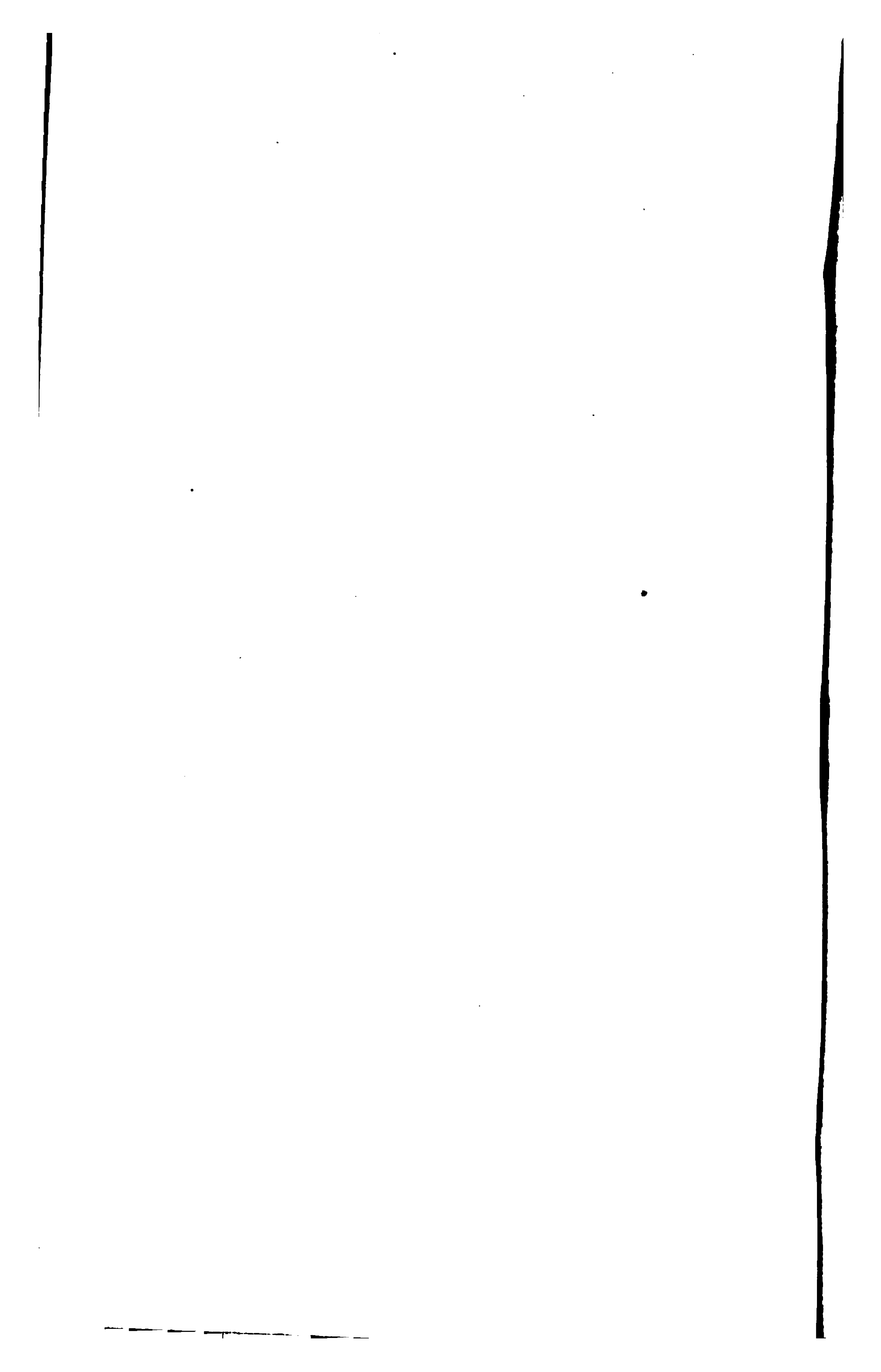
Gedruckt mit Genehmigung
der philosophischen Fakultät der Albertus-Universität zu Königsberg.

Referent:
Herr Prof. Dr. Albert.

Meinen lieben Eltern.



Uebersicht.



Einleitung.

Der Wert der Milcherhitzung und ihr Nachweis.

Unter den Nahrungsmitteln beschäftigt die Kontrolle der Hygieniker seit den letzten Jahrzehnten ganz besonders die Milch. Denn infolge ihrer Zusammensetzung bietet diese einen hervorragend günstigen Nährboden für viele Mikroorganismen, welche sich in diesem Substrat bei Temperaturen von 15° bis ungefähr 40° C., vor allem aber bei ca 35° geradezu fabelhaft schnell[1]) vermehren. Die zahlreichen Arten der Milchbakterien kann man nach der Harmlosigkeit, Nützlichkeit oder Schädlichkeit ihrer Wirkung bezw. Stetigkeit, Häufigkeit oder Zufälligkeit ihres Vorkommens in verschiedener Weise gruppieren. Unter allen nehmen die pathogenen Bakterien das regste Interesse der Human- und Veterinärmedizin in Anspruch, weil sie bestimmte Infektionskrankheiten erzeugen und dieselben, wenn fortpflanzungsfähige Keime in der Milch oder den daraus hergestellten Produkten vorhanden sind, auf Menschen und Tiere weiter zu verschleppen vermögen. Von diesen Infektionskrankheiten kommen hauptsächlich in Betracht[2])

1. als in den Bereich der Sanitätshygiene gehörend: Typhus, Diphteritis, Cholera, Scharlach und die von Tier auf Mensch übertragbaren Ansteckungsstoffe der Tuberkulose, des Milzbrandes und der Maul- und Klauenseuche (Bläschenausschlag).

2. als zur Befugnis der Veterinärhygiene gehörend: Milzbrand, Tuberkulose, Maul- und Klauenseuche, deren Verbreitung vor allem durch die aus den Sammelmolkereien zur Fütterung bezogene Magermilch, Molke u. a. Meiereiabfälle erfolgt.

Durch Milch können ferner übertragen werden[3]) Ruhr, Pocken, Gelbsucht, Tollwut, Rauschbrand und Lungenseuche, wenngleich Näheres über das Verhalten der Milch zu diesen Krankheiten noch wenig bekannt ist.

Hinsichtlich dieser Gefährnisse ist die Forderung der Hygiene, eine möglichst keimfreie Milch in den Verkehr zu bringen, durchaus berechtigt. Denn selbst die von pathogenen Bakterien freie Milch hat sich nicht immer als absolut unschädlich erwiesen (namentlich bei

---

[1]) vergleiche: von Freudenreich „Die Bakteriologie in der Milchwirtschaft" Jena 1898, S. 28. — Stohmann, „Die Milch- und Molkereiprodukte" Braunschweig 1898, S. 342. — Kirchner „Handbuch der Milchwirtschaft" Berlin 1898, S. 69. — Barthel „Die Bakteriologie des Meiereiwesens" Leipzig 1901.

[2]) Näher auf die einzelnen Krankheiten einzugehen liegt nicht im Bereich meines Themas. Die in Anm. 1 verzeichneten Werke enthalten die wichtigsten Literaturangaben über das Verhalten der pathogenen Bakterien.

[3]) Kirchner, Stohmann.

Kindern), ganz abgesehen von der mit sogenannten Milchfehlern behafteten, für den Konsum nicht geeigneten Milch. Zudem liegt es in der Natur der Sache, dass die Milch um so bekömmlicher und haltbarer sein muss, je weniger Organismen an ihrer Zersetzung arbeiten.

Als erprobtestes und unschädlichstes Mittel zur Abtötung der infektiösen Keime und der Milchbakterien überhaupt hat sich die jetzt allgemein angewandte Milcherhitzung erwiesen. Jeder Konsument hat es in der Hand, durch Kochen die Milch annähernd keimfrei zu machen. Annähernd keimfrei, denn je nach dem Grade, bis zu welchem man die Entkeimung treiben will, lassen sich wissenschaftlich drei Arten der Milcherhitzung[1]) unterscheiden, nämlich das Pasteurisieren, das partielle und das völlige Sterilisieren der Milch.

1. Unter Pasteurisieren versteht man ein nach dem französischen Chemiker *Pasteur* benanntes und von ihm zunächst zur Haltbarmachung von Wein und Bier angewandtes Erhitzungsverfahren, wobei eine Temperatur von nur 65° zur Abtötung der meisten Bakterien als genügend sich herausstellte. Auf die viel keimreichere Milch übertragen, versteht man unter Pasteurisieren die Erhitzung derselben auf Temperaturen, die unter dem Siedepunkte des Wassers liegen, also etwa auf 65 bis gegen 100° C. Zweckmässig verbindet man mit dem Pasteurisieren eine schnelle, darauf folgende Abkühlung der Milch auf mindestens 15° C, die der Entwicklung lebend gebliebener Bakterienformen und dem bei höheren Temperaturen (von 70° ab) entstehenden Kochgeschmack entgegenwirkt.

2. Der Ausdruck „partielles Sterilisieren“ umfasst jene Erhitzung der Milch, bei welcher die Wärme des siedenden Wassers voll erreicht oder um wenige Grade überschritten und auf 103 höchstens 105° gesteigert wird, während der Dauer von einer ¾ bis 1 Stunde und zwar unter Anwendung strömenden Dampfes. Dieses Verfahren tötet ebenso wie das Pasteurisieren und das Kochen die vegetativen Bakterien, und zudem in kürzerer Zeit, nicht aber die kochfesten oder Dauerformen, die sogenannten Sporen. Es ist demnach zwischen dem Pasteurisieren und partiellen Sterilisieren kein grosser Unterschied vorhanden.

3. Das „völlige Sterilisieren“ bezweckt die Vernichtung aller Keime, somit auch der die Kochtemperatur überdauernden.

Man erreicht das

a) durch 6—7 stündiges Kochen der Milch;

b) durch Anwendung gespannten Dampfes, und zwar in um so kürzerer Zeit, je höher der Dampfdruck ist (in ½ Stunde bei 130°, in 2 Stunden bei 120°, in 3½ bis 4 Stunden bei 102 bis 103°);

Durch diese beiden Methoden des völligen Sterilisierens erleidet aber die Milch so wesentliche Veränderungen (Bräunung, Geschmacksveränderung), dass sie zur menschlichen Nahrung kaum in Betracht kommen dürfte.

c) durch das discontinuierliche oder fraktionierte Sterilisieren.

Bei letzterem Verfahren wird die Milch zunächst entweder auf hohe Temperaturen pasteurisiert oder auf 100° erhitzt. Die jetzt noch

---

[1]) Kirchner, Stohmann.

vorhandenen Sporen lässt man durch 24 stündiges Aufbewahren bei angemessener Temperatur (30—40°) auskeimen und tötet dann in mehrmaliger Wiederholung dieser Methode die entwickelten, nicht widerstandsfähigen Formen.

Hinsichtlich der pathogenen Bakterien hat die Erfahrung gelehrt, dass die Kochtemperatur, aber auch schon das Pasteurisieren der Milch auf hohe Grade sie vollkommen vernichtet, wenngleich für die einzelnen Arten die kritischen, d. h. zu ihrer Abtötung genügenden Temperaturen und deren Einwirkungsdauer verschieden angegeben werden.[1])

Im grossen und ganzen ist man jetzt dahin einig, das sorgfältige Pasteurisieren auf 80 bis 85° für die Vernichtung der Bakterien der seuchenhaften Krankheiten als hinreichend anzusehen.[2]) Allerdings ist es beim Ausbruch der Maul- und Klauenseuche durch Erlass des preussischen Landwirtschaftsministers vom April 1894 den Molkereien nur dann gestattet, die Magermilch von seuchenkranken oder seucheverdächtigen Kühen wegzugeben, wenn dieselbe vorher entweder wenigstens ¼ Stunde lang bei mindestens 90° erhitzt oder mittelst sogenannter Hochdrucksterilisierapparate auf 100° gebracht worden ist.[3])

Dänemark hat die Milcherhitzung allgemein zur gesetzlichen Pflicht[4]) gemacht, und zwar ist die durch Gesetz vom Juni 1899 vorgeschriebene Temperatur von 85° C. durch eine andere Verordnung vom 1. Oktober 1904 auf 80° C. herabgesetzt worden. Es dürfen dort weder Vollmilch noch Magermilch noch Molke verkauft werden, wenn sie nicht auf 80° erhitzt worden sind, und desgleichen nur von auf 80° pasteurisiertem Rahme stammende Butter und Buttermilch in den Handel kommen. Die preussische Regierung hat bisher keine so tief einschneidenden Verfügungen erlassen, trifft aber beim Ausbruch genannter Epidemieen und Seuchen derartige Spezialvorkehrungen. Auch ist in einigen Regierungsbezirken verordnet worden, die zur Verfütterung dienende Magermilch, Molke und sonstige Meiereiabfälle vor ihrer Abgabe aus den Sammelmolkereien auf mindestens 85° C. zu pasteurisieren, wie auch viele Meiereien die Magermilch aus eigenem Antrieb erhitzen.

Kurz gesagt, der Wert der Milcherhitzung wird auch im Kreise der Konsumenten mehr und mehr anerkannt. Ebenso hat der Landwirt

---

[1]) Vergleiche: van Geuns. Archiv für Hygiene 1889, 369, cit. nach Jahresber. f. Agr. Chem. 1889, S. 645 und 1890, S. 685. — Lazarus und Bitter „Zeitschrift für Hygiene“ Bd. VIII. cit. n. Kirchner, Handbuch etc. S. 97 u. Jahresber. f. Agr. Chem. 1890, 684 ff. — de Man u. Forster „Hygien. Rundschau“ Bd. II, 869, cit. n. Kirchner, S. 97. — Bang, in Barthel „Die Bakteriologie des Meiereiwesens.“

[2]) Vergleiche auch „Die Milchhygiene in ihrer Anwendung auf die Praxis“ v. Dr. H. Tiemann, Molk. Ztg. Hildesheim 1906. Nr. 5. wo es wörtlich heisst: „Was nun die Frage anbelangt, in welchem Masse und in welcher Weise die Erhitzung durchgeführt werden müsste, so beweisen alle bisher von den verschiedensten Forschern auf diesem Gebiete angestellten Versuche, dass eine fast momentane Einwirkung von 85° genügt, um sämtliche in der Milch vorhandenen Krankheitskeime abzutöten. Eine Meinungsverschiedenheit dürfte hierüber kaum noch bestehen, nachdem auch die Herren G. Rat Prof. Schütz-Berlin und Löffler-Greifswald gezeigt haben, dass auch zur Vernichtung der Ansteckungsstoffe der Maul- und Klauenseuche eine Temperatur von 85° C. ausreichend ist.“

[3]) Stohmann.

[4]) nach Barthel „Die Bakteriologie etc.“ und Molkztg. Berlin 1904, 161; cfr. auch Milchztg. 1901 bis 1904 a. verschiedenen Stellen.

es einzusehen gelernt, dass — wie Kühnau sagt — die Erhitzung der Magermilch und Molkereiabfälle die conditio sine qua non ist, wenn er Seuchen von seinem Viehstande fernhalten will.

Hand in Hand mit den Bestrebungen der Hygiene nach Verallgemeinerung des Pasteurisierens arbeiten die Forschungen nach Methoden zum Nachweis der stattgehabten Milcherhitzung bezw. die Bemühungen zur Vereinfachung der bereits bekannten Verfahren. Denn es soll auch der im Dienste der Sanitäts- und Veterinärpolizei stehende niedere Beamte, überhaupt jeder Konsument in den Stand gesetzt werden, genügend erhitzte Milch zu erkennen, um im negativen Falle durch Aufkochen die Vernichtung etwaiger Ansteckungsstoffe selbst vorzunehmen. Aus diesem Grunde kommen zur Zeit nur noch die sogenannten Farbenreaktionen in Betracht, da jene brauchbaren Nachweise, welche auf der teilweisen Umwandlung der in der Milch enthaltenen Eiweisstoffe durch das Kochen beruhen, wie die von Rubner[1]), Soxhlet[2]), Bernstein[3]), Kirchner[4]), Faber[5]), und de Jager[6]) als zu kompliziert und für Massenuntersuchungen zu zeitraubend verlassen worden sind. Das Gleiche gilt auch von den Methoden, die in dem Nachweis bakterieller Einflüsse auf die Milch, z. B. von der neuerdings veröffentlichten Bonnema'schen[7]), sowie des beim Erhitzen freigewordenen Phosphors beruhen. Dagegen sind als nicht zutreffend bezw. unzuverlässig abgeurteilt worden:

Schreiner's[8]) Nachweis von Schwefelwasserstoff beim Kochen frischer Milch, welcher in bereits gekochter beim Erwärmen nicht zu erbringen sein soll. —

Die Unterscheidung nach dem Kochgeruch und Kochgeschmack, weil diese individuell verschieden empfunden werden. —

Die Quévenne'sche[9]) Methode, wonach abgekochte Milch später und weniger vollständig gerinnen soll als unerhitzte. —

Die Plauth'sche[10]) Unterscheidung, indem gekochte Milch bei der Erhitzung plötzlich und in grossen Blasen aufschäumen soll im Gegensatz zu der allmählich und in kleinen Blasen aufwallenden, unerwärmt gewesenen Milch. —

Auch meine vorliegenden Versuche beschäftigen sich mit der Nachprüfung der als am zweckmässigsten befundenen Farbenreaktionen. Insbesondere sollte erprobt werden, ob nicht doch die von verschiedener Seite als unzuverlässig hingestellte Guajakprobe, speziell unter Gebrauch von Guajakholztinktur, bei Beobachtung gewisser Vor-

---

[1]) Rubner. Hyg. Rundschau 1895, 1021; cit. n. Koenig „Die Untersuchung landw. u. gewerbl. wicht. Stoffe" 1898, 365.

[2]) Soxhlet cfr. Stohmann „Die Milch- und Molkereiprodukte" 1898, 338.

[3]) Bernstein. cfr. Referat Molkztg. Hildesheim 1900, 855.

[4]) Kirchner, Handbuch der Milchwirtschaft 1898, 140.

[5]) Faber, The Analyst 1889, XIV, S. 41 cit. n. Siegfeld Milchztg. 1901, 723.

[6]) de Jager, Centralbl. f. med. Wissenschaften 1896. Heft 9, cit. n. Weber, Dissert. Leipzig 1902.

[7]) Bonnema, Chem. Ztg. Cöthen 1905, 182; Molkztg. Hildesheim 1905, 445; Milchw. Centralblatt 1905, Heft 4, 190.

[8]) Schreiner. Molk. Ztg. Berlin 1895, 614.

[9]) Quévenne. Jahresb. d. Tierärztl. Hochschule Hannover 1880/1882, S. 161; cit. n. Weber.

[10]) Plauth. Referat v. Utz Milchztg. 1903, Nr. 9.

schriften sichere Resultate liefert, da sie bei der Wohlfeilheit sowie der Einfachheit der Selbstherstellung der Tinktur das für den Laien am wenigsten umständliche Verfahren ist. Tatsächlich greift man auch in neuester Zeit, wo in milchwirtschaftlichen Instituten das Storch'sche Verfahren vielen Anklang findet, sehr häufig zur Guajakprobe. So verfügte der Regierungspräsident von Breslau[1]) anlässlich der in seinem Bezirk aufgetretenen Maul- und Klauenseuche an die Landräte, dass die in den betreffenden Kreisen stationierten Gendarmen und Polizeibeamten unter Ausrüstung mit einem Fläschchen Guajakholztinktur und einem Reagensglas häufig und unvermutet eine Guajakmischprobe ausführen sollten zur Kontrolle, ob die aus den ausgesperrten Ortschaften und aus Sammelmolkereien weggegebene Milch die vorgeschriebene Erhitzung erreicht hätte, sowie eine öftere Nachkontrolle durch die Kreistierärzte anlässlich ihrer Dienst- und Revisionsreisen.

Bevor ich meine Untersuchungen darlege, möchte ich die zahlreichen Arbeiten auf dem Gebiete der Farbenreaktionen erwähnen. Nach der mir zu Gebote stehenden Literatur kommen in Betracht:

1. Das Guajakverfahren.
2. Die Storch'sche Methode.
3. Die Ursolprobe von Utz.
4. Die Richmond'sche Reaktion.
5. Die Arnold - Mentzel'schen Verfahren mit Paradiaethylparaphenylendiamin und Paradiamidophenylaminhydrochloricum.
6. Die Dupouy'schen Methoden.
7. Die Jodkaliumstärkeprobe.
8. Die Reaktion nach Schardinger.

---

[1]) Molk. Ztg. Hildesheim 1905, 230.

I. Teil.

Die bisher veröffentlichten Ergebnisse der Farbenreaktionen.

1. Das Guajakverfahren.

A. Das Material zur Anfertigung der Guajaktinkturen und der das Guajakblau liefernde Körper.

Die[1]) das Material für die Herstellung der Guajakholz- und Guajakharztinkturen liefernde Stammpflanze, Guajacum officinale, gehört zu der Familie der Zygophylleen und ist ein auf den westindischen Inseln und in Venezuela wachsender immergrüner Baum. Das in dem dunkelgrünen Kernholze bis zu 26 % enthaltene Harz wird enweder durch Einschnitte in den Stamm oder durch Ausschmelzen aus dem Holze gewonnen. Das erstere bildet die Handelssorte Resina Guajaci „in granis", das zweite führt den Namen Resina Guajaci „in massis". Das Harz hat eine grünbraune Farbe, schwach aromatischen Geruch, einen kratzenden Geschmack, ist sehr spröde und zeigt einen glasglänzenden muscheligen Bruch. Das Guajakholz, welches sich durch grosse Schwere und Härte auszeichnet, wird zum Export in Form grosser Scheiben und Blöcke dem Stamm und den Aesten entnommen und dann klein geschnitten oder geraspelt in den Handel gebracht.

Die charakteristische Eigenschaft alkoholischer Auszüge aus Guajakharz oder Guajakholz, mit Oxydationsmitteln eine blaue Färbung anzunehmen, hat seit ihrer Bekanntwerdung die wissenschaftliche Forschung in hohem Masse in Anspruch genommen. So lieferte Schoenbein[2]) in eingehenden Versuchen über die Blaureaktion des Guajakharzes den Beweis, dass u. a. auch das von ihm entdeckte Ozon jene Färbung hervorzurufen imstande ist. Infolge der von ihm vertretenen Ueberzeugung, dass unter Ozon aktiver Sauerstoff zu verstehen ist, nimmt er an, dass die gebläute Guajaktinktur eine lose Verbindung des Guajaks mit aktivem Sauerstoff enthält, und bezeichnet den entstandenen Körper als ein Ozonid. Durch weitere Versuche mit Mangan-, Blei- sowie Silbersuperoxyd zeigte er, dass auch Superoxyden die Fähigkeit der Guajakbläuung in hohem Masse eigen ist, und machte insbesondere darauf aufmerksam,[3]) dass Wasserstoffsuperoxyd und diesem analoge Verbindungen in aetherischen Oelen bei Gegenwart von tierischen und pflanzlichen Fermenten Ozonwirkung auf Guajak zu äussern vermögen. Hadelich[4]) wie auch Schaer[5]) stellten dann fest, dass

---

[1]) Richter „Zur Kenntnis des Guajakharzes", Dissertation Halle 1903, S. 6.

[2]) cit. n. Richter „Zur Kenntnis des Guajakharzes", Dissertation Halle 1903. S. 44.

[3]) nach Zink „Ueber die Unterscheidung roher und gekochter Milch vermittelst der Guajaktinktur" Milchztg. 1903. Nr. 13.

[4]) Hadelich: Journal für prakt. Chemie Bd. 87, cit. nach Richter, S. 45.

[5]) Schaer: Forschungsberichte über Lebensmittel und ihre Bez. zur Hygiene etc. 1895, cit. nach Richter, S. 45.

die Guajakonsäure der die Blaufärbung liefernde Körper ist. Richter[1]) gelang es, die Guajakonsäure in zwei Körper zu trennen, von denen der eine — die α = Guajakonsäure — die Eigenschaft der Blaufärbung besitzt, während der andere — die β = Guajakonsäure — gegen Oxydationsmittel vollständig indifferent ist. Durch Reduktion des Guajakblaues erhielt er nämlich ein Produkt von derselben elementaren Zusammensetzung als die α = Guajakonsäure, das durch Oxydation wiederum ein Blau lieferte, welches genau dem aus der α = Guajakonsäure direkt gewonnenen entsprach.

B. Die Guajaktinktur als Milchreagens.

Die Guajakmischprobe.

Bereits 1842 hat H. Schacht[2]) mitgeteilt, dass frische Milch mit Guajaktinktur sich blau färbt, während gekochte die Reaktion nicht gibt. Hiernach dürfte dieser Autor wohl der erste gewesen sein, der die Guajakreaktion bei Milch beobachtet hat.

Auch Arnold[3]) gründete auf die Guajakbläuung seine Mischprobe zur Unterscheidung roher und gekochter Milch. Nach ihm gibt rohe Milch sowie solche, die nur auf 40 bis 60° C. erhitzt gewesen ist, mit Guajaktinktur sofort oder nach wenigen Sekunden eine mehr oder weniger starke, erst nach längerer Zeit verblassende Blaufärbung. Auf 70 bis 78° erhitzte Milch zeigt die Bläuung zwar auch sofort aber schwächer, über 80° erwärmte sowie jede einmal aufgekochte Milch bleibt dagegen ungefärbt, sowohl beim Anstellen der Probe in der Wärme wie auch nach dem Erkalten. Als Ursache der Blaufärbung nimmt Arnold die Anwesenheit von Ozon in frischer Milch an und findet einen Beweis hierfür in der schnellen Blaufärbung eines Gemisches von Rohmilch und Jodkaliumstärkekleister nach Zusatz von altem Terpentinöl.

In der Folge wurde die Arnold'sche Probe verschiedentlich, u. a. von Rubner[4]), als unzuverlässig bezeichnet, vornehmlich deshalb, weil die Reaktion auch bei ungekochter Milch zuweilen ausbleibe, und es vor allem unmöglich sei, Zusätze von roher zu stark erhitzter Milch zu erkennen.

Ostertag[5]) führt das Ausbleiben der Reaktion bei Rohmilch in erster Linie auf zu geringe Zusätze an Guajaktinktur, dann auch — besonders bei Prüfung eines Gemisches aus roher und gekochter Milch — auf unzulängliche Beobachtungszeit zurück. Bei dem von ihm empfohlenen Tinkturzusatze zur Rohmilch im Verhältnis 1 : 10 tritt nach seinen Angaben die Reaktion sicher und schnell (etwa nach 20 bis 30 Sekunden) ein, während in gekochter Milch selbst nach stundenlanger Beobachtung sich keine Blaufärbung bemerkbar macht.

---

[1]) Richter. Dissertation. S. 46 ff.

[2]) Arch. d. Pharm. 1842, Heft 3. S. 3; Pharm. Centralh. Bd. XXII; Fresenius. Zeitschr. f. analyt. Chem. 21, 285.

[3]) Jahresbericht d. Königl. Tierärztl. Hochschule Hannover 1880/82, 161 cit. n. Weber Dissertation Leipzig 1902.

[4]) Rubner. Hygienische Rundschau, Bd. 5. Heft 22. cit. n. Weber.

[5]) Ostertag. Ref. Molk.-Ztg., Berlin 1896, 507.

Bezüglich Mischmilch konnte Ostertag noch einen Rohmilchzusatz von 15 % erkennen; bei geringeren Zusätzen war der Nachweis unsicher. Ostertag gibt daher der Arnold'schen Mischprobe folgende exakte Modifikation:

Als Apparat sind erforderlich

a) ein Reagensglasständer,
b) eine grössere Anzahl passender auf 10 ccm geaichter Reagensgläschen (Milchgläschen),
c) eine kleinere Anzahl schmälerer auf Kubikzentimeter geaichter Gläschen. (Guajakgläschen),
d) eine 25 ccm-Pipette.

Ausführung der Probe:

Mittelst der Pipette wird der zu untersuchenden Milch eine Probe entnommen und auf 2 Milchgläschen (das zweite dient zur Kontrollprüfung) bis zum Aichstrich verteilt. Sodann wird in den Guajakgläschen die Tinktur abgemessen und der Milch zugesetzt. Unter Verschliessen der Oeffnung mit dem Daumen schüttelt man das in den Milchgläschen befindliche Gemisch durch, stellt die Gläschen in den Reagensglasständer und beobachtet 2 Minuten. Zeigt sich innerhalb dieser Zeit keine Blaufärbung, so ist die Milch weder im Ganzen roh noch mit einer grösseren Menge von Rohmilch durchmischt. Zur Vermeidung von Fehlschlüssen resp. zur Feststellung später eintretender Reaktionen empfiehlt Ostertag, die Proben 1 Stunde stehen zu lassen.

Carcano[1]) versetzt einige ccm Milch in einer Porzellanschale mit einigen Tropfen altem Terpentinöl, erwärmt schwach und gibt etwas Guajakharztinktur hinzu: rohe Milch zeigt Blaufärbung.

Nach Dupouy[2]) darf alkoholische Guajaktinktur nicht frisch und nicht zu alt sein, da sie dann bisweilen versage (Mangel an oxydierbaren Stoffen). Er findet das Verfahren aber stets zuverlässig, wenn man dem Gemisch von Milch und Tinktur 1 Tropfen 10%iges Wasserstoffsuperoxyd zusetzt und im Wasserbade bei 40° erhitzt.

Glage[3]) hat drei im Handel vorkommende Tinkturen, nämlich:

a) Holztinktur in verdünntem Weingeist (1 :5),
b) Harztinktur in reinem Weingeist (1 : 5) und
c) Ammoniakhaltige Harztinktur, signiert als Tinctura Guajaci ammoniata s. volatilis (Harz pulv.: Weingeist: Ammoniak = 3 : 10 : 5)

nachgeprüft. Eine vierte, die Harz-Fencheltinktur s. Tinctura foeniculata (Fenchelöl: Harz: Weingeist = 1 :4 : 20) hat er nicht berücksichtigt. Auf Grund seiner Versuche hält Glage die ammoniakalische, ferner die Fencheltinktur für nicht brauchbar. Das Gleiche gilt für die Guajakharztinkturen, von denen nur 4 unter den 27 geprüften die Reaktion gaben, während von 31 Holztinkturen 14 (beinahe 50 %) sich

---

[1]) Carcano. Bolletino chim. farmac. 1896, 486, cit. n. Merck's Rep. 1900, 254 u. Pharm. Centralh. 1897, S. 392 ff.

[2]) Dupouy. Pharm. Centralh. 1897, 392 (nach Rép. de Pharm. 1897, 206); ferner Molk. Ztg. Berlin 1897, 283 u. Milch-Ztg., 1903, 211.

[3]) Glage. Ref. Milch-Ztg. 1901, 182.

als reaktionsfähig erwiesen. Glage meint, dass die nicht reagierenden Harztinkturen vielleicht aus bereits oxydiertem, somit nicht mehr brauchbarem Harze hergestellt seien. Auch leidet nach seiner Ansicht die Brauchbarkeit von Harztinkturen dadurch, dass diese öfters Fällungen hervorriefen, wodurch die Reaktion stets gestört werde. Glage rät deshalb nur zur Anwendung von Holztinkturen, welche stets vor dem Kauf und auch später von Zeit zu Zeit auf ihre Brauchbarkeit zu prüfen, gut verkorkt aufzubewahren und alljährlich zu erneuern seien, da über die Haltbarkeit der Tinkturen noch zu wenig Erfahrungen vorlägen. (Nach Glage gab die Tinktur noch nach 9, nach Ostertag noch nach 5 Monaten die Blaureaktion, wird aber von beiden für viel länger reaktionsfähig gehalten.) Im übrigen bezeichnet Glage die Arnold'sche Probe als das einfachste und zweckmässigste Milchprüfungsverfahren.

Kühnau[1]) und Mauderer[2]) finden die Guajakprobe ebenfalls zuverlässig. Kühnau ist für den alleinigen Gebrauch der Holztinktur und für ein Mischungsverhältnis von Tinktur: Milch = 1 : 15. Gut verkorkt hält sich die Tinktur nach seiner Ansicht jahrelang.

Süss[3]) mischt in einem weiten Reagensglas 20 ccm Milch mit 2 bis 3 ccm Guajaktinktur. Guajakholztinktur (Holz : Weingeist (90 %) = 1 :5) wie Guajakharztinktur (Harz : Weingeist (90 %) = 1 : 25) geben frisch bereitet mit Rohmilch keine Blaufärbung, wohl aber beide, wenn sie mehrere Wochen vor Licht geschützt beiseite gestellt worden sind.

Siegfeld[4]) bemängelt, dass die Guajaktinktur nicht immer in guter Beschaffenheit zu haben sei, und eine verhältnismässig grosse Menge davon angewandt werden müsste. Er empfiehlt die Tinktur nur in frischem Zustande und mit Zusatz von Wasserstoffsuperoxyd (cf. Tab. B. S. 43.)

Utz[5]) beanstandet das Guajakverfahren als unzuverlässig.

du Roi und Köhler[6]) heben als Fehler der Guajakholztinktur hervor, dass diese nicht in gleichmässig wirksamem Zustande zu erhalten sei.

Die Arnold-Weber'sche Guajakringprobe.

Infolge der unablässig wiederholten Zweifel an der Zuverlässigkeit der Mischprobe beschäftigten sich Weber sowie auch Arnold und Mentzel eingehender mit dem Guajakverfahren und ermittelten unabhängig von einander eine neue Methode, welche unter dem Namen „Die Arnold-Weber'sche Guajakringprobe" (auch Zonen- oder Schichtreaktion genannt) bekannt geworden ist. Massgebend war hierbei für die Versuchsansteller die Tatsache, dass Farbenreaktionen an der Berührungsstelle der sie hervorrufenden Agentien am deutlichsten auftreten.

---

[1]) Kühnau. Milchzeitung 1901, 327.
[2]) Mauderer. Deutsche tierärztl. Wochenschr. cit. n. Zink Milchztg. 1903. Nr. 13.
[3]) Süss: Pharm. Centralh. 1902, 113.
[4]) Siegfeld. Milch-Ztg. 1901, 723.
[5]) Utz. Pharm. Centralh. 1901, 149.
[6]) du Roi u. Köhler n. Milch-Ztg. 1902, 17.

A. Die Befunde Webers.

Weber[1]) begann seine Arbeit mit umfangreichen Parallelversuchen zwischen der Mischprobe und seinem eigenen Verfahren. Von dem Gebrauch der so oft als mangelhaft gerügten Harztinktur nahm er von vornherein Abstand und benutzte, um gleichmässige Resultate zu erhalten, durchweg ein und dieselbe vor dem Kauf mehrmals mit Rohmilch als kräftig wirksam befundene Guajakholztinktur in Alkohol.

Die Prüfung der Vollmilch erstreckte sich sowohl auf Proben verschiedenen Alters, also auf soeben ermolkene bis vollkommen saure Milch, wie auch auf solche von verschiedener Herkunft, d. h. auf Milch von einzelnen Kühen, Sammelmilch, ferner Morgen-, Mittags- und Abendmilch. Hierbei fand Weber die Unzuverlässigkeit der Arnold-Ostertag'schen Mischprobe bestätigt, denn des öfteren blieb die Blaureaktion entweder ganz aus, oder sie erfolgte nur schwach bezw. in beiden Fällen erst auf sehr starken Tinkturzusatz (bis zu 20 %) scharf. Weber rät aber von einem derartig hohen Tinkturverbrauch entschieden ab, weil die Probe dadurch zu kostspielig würde.

Ausnahmslos günstige Resultate lieferte ihm hingegen seine Schichtprobe, welche folgendermassen auszuführen ist:

1) In ein möglichst kurzes nicht zu enges (an der Oeffnung ca. 2 cm breites) Reagensglas gibt man 1 bis 2 ccm Milch.

2) Das Reagensglas wird sodann in einem passenden Ständer untergebracht.

3) Hierauf träufelt man von der Guajaktinktur, die zweckmässig in einer weissen Tropfzählflasche von 100 gr Inhalt aufbewahrt wird, etwa 3 Tropfen direkt auf die Oberfläche der Milchprobe und beobachtet.

4. Proben, bei denen die Tinkturtropfen an der Wandung des Reagensgläschens zur Milch hinabfliessen, sind von der Kontrolle auszuschliessen.

5. Erschütterungen des Reagensgläschens sind zu vermeiden, da hierdurch die Deutlichkeit und die Haltbarkeit der Zonenreaktion beeinflusst wird.

Nach dem Zusatz der 3 Tropfen Tinktur machte sich bei den Weber'schen Versuchen in jeder rohen süssen Milch innerhalb 5 bis 20 Sekunden, in jeder rohen sauren Milch spätestens nach 2 Minuten ein ca. 1 bis 3 mm breiter blauer bis blaugrüner Ring bemerkbar. Die Intensität bezw. die Reinheit, ferner die Breite und die Haltbarkeit der blauen Zone wuchsen allmählich mit dem Alter einer Milch. In gekochter Milch blieb die Reaktion auch bei einer Beobachtungszeit von 12 Stunden vollkommen aus.

Der Wendepunkt für das Eintreten des blauen Ringes liegt nach Weber zwischen 75 bis 78°. Denn während sich auf 70° erhitzte Milch noch genau so wie rohe verhielt, machte sich bei soeben auf 75° pasteurisierter bereits eine Reaktionsträgheit bemerkbar, indem die Reaktion in der Regel erst nach 5 Minuten erschien. Bei zunehmendem Alter solcher Milch kam die blaue Zone wieder früher und nach durch-

[1]) Weber. Dissertation Leipzig 1902: Die zur Unterscheidung roher und gekochter Milch dienenden Untersuchungsmethoden; cfr. auch Milchztg. 1902, Nr. 42 und 43.

schnittlich 30 stündigem Stehen wieder nach 2 Minuten. 5 Minuten auf 75° erhitzte Milch verhielt sich genau so, wogegen soeben oder 5 bis 10 Minuten auf 78, 80, 85, 90 und 100° gebrachte Milch innerhalb ½ Stunde auch nicht die geringste Spur einer blauen Zone bemerken liess.

Weiterhin erwies sich die Ringprobe auch bei Magermilch, Molke, Milchserum sowie bei Eismilch nach dem Auftauen und auch bei Kolostralmilch brauchbar.

Ueber Mischmilch berichtet Weber:

a. Rohmilchzusätze von 50 % sind schnell und sicher nachweisbar.
b. Rohmilchzusätze von 20 bis 40 % sind zuverlässig, aber erst nach längerer Beobachtungszeit, spätestens nach 12 Minuten zu erweisen.
c. Der Rohmilchzusatz von 10% ist erst nach längerer Kontrolle, spätestens nach 15 Minuten, und dann auch noch unsicher zu erkennen.

Ungefähr 10 % der mit letzterer Mischmilch angestellten Proben zeigten nach 15 Minuten noch keine Spur einer Blaufärbung.[1])

Weber konstatierte zwar je nach der Höhe des Rohmilchzusatzes gewisse Abstufungen in dem Erscheinen, der Breite, der Vollständigkeit und der Haltbarkeit des blauen Ringes; jedoch kann er in diesen Verschiedenheiten einen Massstab für die Stärke des Rohmilchzusatzes nicht aufstellen. Denn genau so wie bei Rohmilch der Zeitpunkt der Untersuchung und die Individualität der Milchprobe auf die Zonenreaktion von wesentlichem Einfluss seien, werde auch bei Mischmilch der Eintritt und die Beschaffenheit des blauen Ringes bedingt:

a. von dem Alter,
b. von den individuellen Eigenschaften der zum Mischen verwendeten Rohmilch.

Weber untersuchte ausserdem noch mit Konservierungsmitteln versetzte Milch. Dabei ergab sich folgendes:

1. Natriumkarbonat, Natriumbikarbonat, Benzoësäure, Salicylsäure, Borsäure, Phosphorigsaures Natron und Unterphosphorigsaures Natron hatten auf den Eintritt der Reaktion keinen Einfluss. Nur war bei stärkeren Zusätzen von Natriumkarbonat bezw. = bikarbonat die Zone ausgesprochen grün.

2. Formalin in geringerer Menge beeinträchtigte die Blaufärbung nicht. In starker Gabe (4 Tropfen pro 100 ccm) verzögerte es 60 Stunden nach dem Zusatze die Ringreaktion bis zu 5 Minuten, nach Verlauf von 90 Stunden hob es jene zuweilen auf. Dieses zeigte sich in 50 % der Versuche.

3. Wasserstoffsuperoxyd verhielt sich dem Formalin ganz ähnlich. Denn während es in geringer Quantität auf die Ringprobe nicht einwirkte, wurde bei stärkerem Zusatze (10 Tropfen pro 100 ccm Rohmilch) die Reaktion zuweilen unsicher und undeutlich, indem der blaue Ring erst nach ca. 7 Minuten ganz schwach eintrat oder ausblieb. Solches ergab sich ebenfalls in 50 % der Fälle.

---

[1]) Mischmilch mit noch geringerem Rohmilchgehalt hat Weber nicht geprüft.

4. Bei schwefligsaurem Natron kam die Reaktion sowohl auf starke wie auf schwache Zusätze nie zustande. Von unterschwefligsaurem Natron beeinflussten schon schwache Mengen den Eintritt und die Intensität der Ringfärbung, besonders aber starke; denn die Zonen erschienen hier erst nach 18 bis 25 Minuten in äusserst matter Farbe.

5. Kleine Zusätze von Chromsäure oder Kaliumbichromat zeigten keinerlei Einwirkung auf die Reaktion. Starke beschleunigten sie hingegen und machten ihre Färbung intensiver; sehr starke riefen sogar in erhitzter Milch eine deutliche Blaufärbung hervor.[1])

Weber führt letztere Erscheinung auf die starke Oxydationswirkung der Chromsäure zurück und stellte durch Versuche fest, dass auch eine wässrige Chromsäure- bezw. Kaliumbichromatlösung auf Zusatz von Guajakholztinktur die blaugrüne Zonenreaktion zustande bringt. Als Gegensatz dazu erklärt er das Fortbleiben der Ringreaktion bei schwefligsaurem resp. ihre wesentliche Verzögerung durch unterschwefligsaures Natron aus der bedeutenden Reduktionskraft dieser Stoffe.

Weber resümiert seine Ergebnisse über konservierte Milch in dem Hinweis, dass mit Ausnahme des schwefligsauren wie unterschwefligsauren Natrons die geprüften Substanzen in dem schwachen Masse, wie sie im Milchverkehr lediglich zur Geltung kämen, auf die Guajakringprobe keinen Einfluss hätten. Handele es sich dagegen darum, durch „starke“ Konservierung Milch für eine spätere Guajakprobe zurückzustellen, so seien Formalin, Wasserstoffsuperoxyd, Chromsäure und Kaliumbichromat auszuschalten. Schwefligsaures und unterschwefligsaures Natron müssten in jedem Falle vermieden werden.

Um auch über die Brauchbarkeit der käuflichen Tinkturen einigen Anhalt zu haben, prüfte schliesslich Weber 15 in verschiedenen Apotheken erstandene Guajakholzauszüge. Unter diesen gaben 14, welche von dunkler aber durchscheinender Farbe waren, sehr deutliche, 50 % davon sogar vorzügliche Reaktionen. 1 Tinktur von tiefdunkler nicht durchscheinender Farbe erwies sich dagegen in keinem Falle als reaktionsfähig.

Eine frisch hergestellte Holztinktur erzeugte im Alter von 1 bis 14 Tagen bei 14 Rohmilchproben keine Reaktion, zwischen 15 bis 45 Tagen bei 30 Milchproben an der Stelle des Auftropfens einen blauen Strich. Im Alter von 45 bis 90 Tagen entstand bei 50 Proben ein schwacher, oft nicht zusammenhängender, blauer Ring und über 90 Tage hinaus die Zone in tadelloser Deutlichkeit.

Auf Grund dessen gibt Weber noch folgende Ratschläge:

a. Jede Holztinktur von dunkler Farbe, welche sich, gegen das Licht gehalten, nicht als durchscheinend erweist, ist von der Verwendung auszuschliessen. Denn sie ist entweder sehr alt oder aus fehlerhaftem, bereits oxydiertem Guajakholz hergestellt.

b. Holztinktur, die durchscheinend und mindestens 3 Monate alt ist, gibt brauchbare Resultate.

---

[1]) Siegfeld hat dasselbe bei der Mischprobe festgestellt. cfr. Tabelle B. Seite 43.

c. Die Forderung Glages, die Tinktur in gewissen Zwischenräumen vor Anstellung der Probe mit Rohmilch auf ihre Wirksamkeit zu versuchen, ist auch auf die Guajakringprobe zu übertragen.

B. Die Ergebnisse von Arnold und Mentzel.

Arnold und Mentzel[1]) beobachteten, dass Guajakholz- wie harztinkturen nie versagten, wenn sie die Rohmilch damit überschichteten. Gekochte Milch zeigte selbst nach 24 Stunden noch keine Blaufärbung. Besonders reine und intensive Zonen erhielten die Versuchsansteller mit Acetontinkturen. Auch gelang es ihnen mit Tinkturen, die durch andere Extraktionsmittel als Alkohol oder Aceton gewonnen waren und unwirksam blieben, nach Durchschütteln mit Aceton eine mehr oder minder deutliche Reaktion zu erzeugen. Sie betrachten deshalb das Aceton als das geeignetste Auszugsmittel für Guajakholz- wie auchHarz. Eine Extraktion aus Guajakharz in Aceton im Verhältniss 1 :10 sei bei Anwendung von pulv. subtillis. (= von höchst fein pulverisiertem Harze) durch kräftiges Schütteln in einigen Minuten bewirkt und dem Auszug von Guajakholz mit Aceton vorzuziehen. Die Guajakharz-Acetontinktur bleibe in brauner Flasche mit Glasstöpselverschluss mindestens 3 Monate lang wirksam. Mittelst der empfohlenen Tinktur gelang es Arnold und Mentzel, noch 12½ % roher in gekochter Milch deutlich zu erkennen. Jedoch halten sie von 25 % Rohmilchzusatz an abwärts die Mischprobe für empfehlenswerter, weil bei ihren Versuchen die Blaufärbung dann schneller erfolgte als bei der Ringprobe. Die blaue Zone trat auch bei roher Sahne und bei rohem, mit Hilfe von Alaun oder organischen Säuren bereitetem Serum sehr scharf ein. Die Gegenwart freier organischer Säuren verhinderte dagegen die Blaufärbung, ein Fall, welcher sich nach der Ansicht der Versuchsansteller in der Praxis kaum ereignen dürfte.—

Neumann-Wender[2]) untersuchte eine grössere Anzahl teils aus Apotheken stammender, teils selbst bereiteter Tinkturen. Hierbei erzeugten sowohl Guajakholz- wie Harzauszüge die Reaktion, wenn sie vorher mindestens 8 bis 10 Tage dem Licht und der Luft ausgesetzt gewesen waren. Frische Tinkturen gaben keine Blaufärbung. Dieses Verhalten führt Neumann-Wender darauf zurück, dass in vielen Körpern bei Gegenwart von Licht und Luft eine — zuerst von Schönbein und Traube beobachtete — sogenannte Autooxydation stattfindet, welche bei der Guajaktinktur ziemlich schnell vor sich geht, aber in ganz frischen Auszügen sich noch nicht bemerkbar macht.

Nach Bekanntwerden der Arnold-Weber'schen Methode stellte Zink[3]) eine genaue Nachprüfung sowohl der Ringprobe wie des Mischverfahrens an. Bei letzterem wurde hauptsächlich nach dem Quantitativverhältnis Ostertag gearbeitet. Die Mischprobe zeigte sich unsicher, indem die Färbung entweder überhaupt ausblieb oder momentan

[1]) Arnold und Mentzel. Ref. Milch-Ztg. 1902, 247.
[2]) Neumann-Wender. Molk. Ztg. Berlin 1903, 62.
[3]) Zink. Milch-Ztg. 1903, No. 13. (Mitt. a. d. milchw. Institut Hamburg.)

nur eine schwache Bläuung eintrat. Dagegen erfolgte bei denselben Milchproben mit dem Guajakringverfahren nach wenigen Sekunden eine blaue Zone. Die Anwendung von 3 Tropfen Guajaktinktur (Weber) erscheint Zink jedoch als zu gering, da er damit bisweilen nur kleine Flecke erhielt. 6 bis 8 Tropfen lieferten ihm deutlichere, intensivere und längere Zeit haltbare Zonen. Zink benutzte durchweg selbst hergestellte Guajakholz- als auch Harztinkturen und zwar hauptsächlich in der Konzentration 1 : 10 seltener 1 :5, zuweilen aber auch solche vom Ansatzverhältnis 1 :20 und 1 : 50. Er konnte einen wesentlichen Unterschied zwischen Harz- und Holztinkturen nicht finden. Die schönsten und reinsten Färbungen gaben ihm jedoch 10- und 5 %ige Harztinkturen. Daher bevorzugt Zink diese, zumal ausserdem

a. Harztinkturen die Reaktionsfähigkeit schneller annähmen als Holztinkturen;

b. die Holztinkturen, namentlich die aus den Apotheken bezogenen, je nach der Konzentration einen geringeren Gehalt an oxydierbarer Substanz bezw. Guajakonsäure besässen als die Harztinkturen;

c. bei den Harztinkturen die schädigenden Einflüsse der Gerbsäure und sonstiger aus dem Holze stammender Extraktivstoffe mehr ausgeschlossen seien, falls nicht gerade das der Tinktur zu Grunde liegende Harz durch Extraktion aus dem Guajakholz gewonnen sei.

Zink fand wie Weber, Mauderer[1]) und Neumann-Wender,[2]) dass ganz frische Tinkturen mit Rohmilch keine Farbenänderung bewirkten. Seine Tinkturen liessen die ersten Zeichen der Guajakbläuung mit Rohmilch frühestens nach 2, meist zwischen 4 bis 10 Tagen, zuweilen aber erst noch später erkennen. Ferner konnte Zink ebenso wie Neumann-Wender konstatieren, dass der Zutritt von Licht und Luft die Autooxydation der Guajakauszüge begünstigt. Denn es riefen Tinkturen, welche längere Zeit nach ihrem Ansatze immer noch unsicher reagierten resp. z. T. vonZink im Dunkeln gehalten und unwirksam waren, binnen kurzer Frist und zwar vielfach schon in 1 bis 2 Tagen eine deutliche Reaktion hervor, wenn er dieselben nur mit Watte verschlossen direkt dem Licht aussetzte. Da andrerseits aber auch ständig im Dunkeln und unter Glasstopfenverschluss aufgestellte Guajaktinkturen mit der Zeit reaktionsfähig wurden, erkennt Zink die Einwirkung genannter Faktoren nicht als ausschliessliche Bedingung der Autooxydation an.

Eine selbst hergestellte Harz-Acetontinktur, die nach 10 Tagen die ersten Zeichen der Blaufärbung gezeigt und sich in der Folge äusserst wirksam erwiesen hatte, liess nach kaum Jahresfrist eine bedeutende Abnahme der Reaktionskraft bemerken. Dagegen bewährten sich von 2 mit Alkohol gewonnenen Harztinkturen die eine auch nach Verlauf 1 Jahres, die andere, viel früher hergestellte, sogar noch nach 3½ Jahren.

Zink zieht aus seinen Parallelversuchen zwischen Guajakmisch- und Schichtprobe folgende Schlüsse:

---

[1]) Mauderer. Deutsche tierärztl. Wochenschr. 1902, No. 39 u. 40.
[2]) Neumann-Wender. Oesterr. Chem. Ztg. 1903, No. 1 u. Molk. Ztg. Berlin 1903, 62.

1. Die Ausführung der Reaktion als Mischprobe, wie sie Arnold und Ostertag vorgeschlagen haben, kann zu Täuschungen Anlass geben, da bei nachweislich ungekochter Milch die Blaufärbung zuweilen ausbleibt.

2. Die Schichtprobe ist wegen ihrer grösseren Empfindlichkeit der Mischprobe vorzuziehen. Empfenswert ist es, wie Weber angibt, die Tinktur tropfenweise auf die Milch fallen zu lassen, damit eine gelinde Mischung beider Komponenten eintritt.

3. Mit 10 %igen oder besser 5 %igen Tinkturen entstehen reinere Blaufärbungen als mit 20 %igen. Alkohol scheint das geeignetste Extraktionsmittel für Guajakharz zu sein. Bezüglich des Acetons liegen genügend Erfahrungen noch nicht vor.

4. Frisch bereitete Guajaktinktur gibt mit roher Milch keine Blaufärbung. Nach längerem Stehen, namentlich bei Licht- und Luftzutritt, nimmt die Tinktur die rohe Milch bläuende Eigenschaft allmählich an, welche sie dann viele Jahre beibehalten kann.

Zink prüfte ferner, durch die Siegfeld'schen und Dupouy'schen Beobachtungen aufmerksam gemacht, den Einfluss des Wasserstoffsuperoxydes auf die Guajakreaktion. In seinem Bericht darüber erläutert Versuchsansteller an der Hand einiger Veröffentlichungen zunächst die Rolle des Wasserstoffsuperoxydes bei der Guajakbläuung. Ich lasse das Wesentlichste davon, soweit der betreffenden Autoren nicht bereits an anderer Stelle[1]) Erwähnung getan ist, in Kürze folgen:

„Schaer[2]) hat die Fermentwirkung der rohen Milch zum Nachweise von Wasserstoffsuperoxyd empfohlen. Werden, wie Schaer angibt, kleinste Mengen von Wasserstoffsuperoxyd mit Guajaktinktur zusammengebracht, so nimmt die zunächst unverändert bleibendeMischung durch Zusatz der Fermente des Malzauszuges, des Speichels, der frischen Milch, der roten Blutkörperchen nach kurzer Zeit eine, in ihrer Intensität der Menge des Wasserstoffsuperoxydes entsprechende, Blaufärbung an. Nach Schoenbein[1]) und Schaer[2]) besitzen eine dem Wasserstoffsuperoxyd analoge Wirkung auch verschiedene ätherische Oele, indem sie allmählich organische Superoxyde bilden, denen die Eigenschaft zukommt, nur bei Gegenwart von Sauerstoffüberträgern Guajakharz zu bläuen. Allerdings können ätherische Oele, welche längere Zeit unter gleichzeitiger Belichtung mit atmosphärischem Sauerstoff in Berührung gestanden haben, infolge Ozonbildung vorübergehend direkt die Guajakharz bläuende Eigenschaft annehmen, die dann auch bei Anwesenheit von gekochter Milch bestehen bleibt."

„Aus allen neueren Feststellungen geht hervor, dass die Oxydationserscheinung aktiver Guajaktinktur beim Vermischen mit Rohmilch zweifellos auf Enzymwirkung zurückzuführen ist, und dass hierbei höchstwahrscheinlich die in pflanzlichen und tierischen Säften weit verbreiteten oxydativen Fermente in Frage kommen und zwar in erster Linie die sogenannten indirekten oder Anaeroxydasen, welche mit Guajaktinktur erst bei Gegenwart von Wasserstoffsuperoxyd reagieren,

[1]) Vergl. Schönbein, Hadelich S. 12; Carcano S. 14: hat oxydiertes Terpentinöl bei der Guajakreaktion verwendet.

[2]) Schaer. Forschungsberichte Bd. III. S. 10.

aus dem sie den Sauerstoff zur Oxydation entnehmen können (Bourquelot) [1]."

„Der Umstand, dass frisch hergestellte Guajaktinktur mit Rohmilch keine Blaufärbung gibt, erklärt sich daraus, dass in der Guajaktinktur mit der Zeit, begünstigt durch die Einwirkung von Licht und Luft, eine allmähliche Bildung von Wasserstoffsuperoxyd oder ähnlicher Peroxyde vor sich geht, wodurch die Reaktionsfähigkeit der Tinktur bedingt wird. Durch Erhitzen der mit Wasser verdünnten Tinktur sowie durch Zusatz von verdünnten Säuren gelingt es, die Aktivität zu zerstören. (Neumann-Wender) [2]."

„Die Unfähigkeit mancher Guajaktinkturen, rohe Milch zu bläuen, ist daher nicht, wie bisher meist angenommen wurde, auf einen Fehler oder die schlechte Beschaffenheit der Tinktur zurückzuführen. Sie ist vielmehr durch den Mangel an Superoxyden bedingt bezw. beweist, dass in der Milch keine Enzyme vorhanden sind, welche imstande wären, den Sauerstoff der Luft zu übertragen. (Carnot, Bourquelot.)[3]"

„Neumann-Wender bestätigt die Schaer'schen Beobachtungen insofern, als bei seinen Versuchen Gemische von Auszügen aus Hafergrütze oder Malz mit frischer Guajaktinktur sich unter Zusatz von Wasserstoffsuperoxyd sofort bläuten, fand aber, dass bei Rohmilch mit geringen Mengen Guajaktinktur auch dann keine Blaufärbung eintrat, wenn er ihr Wasserstoffsuperoxyd zuführte. Infolgedessen nimmt er an, dass in der Milch ein reduzierender Körper vorhanden sei, der den Sauerstoff an sich reisst und so die Bildung des Guajakonsäureozonids inhibiert. Da andere oxydierbare Körper, wie Paraphenylendiamin, Ursol, Jodzinkstärkekleister, mit roher Milch und Wasserstoffsuperoxyd zusammengebracht sofort unter deutlicher Blaufärbung reagieren, so schliesst Neumann-Wender, dass die Guajakonsäure schwieriger oxydierbar sei als erstgenannte Stoffe."

Letztere Angaben Neumann-Wender's fanden in Zink's[4]) Versuchen nicht in vollem Umfang ihre Bestätigung, da fast bei allen Milchproben (Zink untersuchte hunderte) der Zusatz von Wasserstoffsuperoxyd selbst bei Anwendung sehr geringer Tinkturmengen stark positive Reaktionen hervorrief. Frische Tinkturen wie auch solche, welche bisher die Blaufärbung nicht bewirkt hatten, reagierten sofort oder innerhalb einiger Minuten; desgleichen sowohl die in Apotheken käuflichen im Verhältnis 1 : 5 angesetzten, als auch verdünnte 10 bis 1 %ige Holz- oder Harztinkturen, einerlei welchen Alters und ob Alkohol oder Aceton als Extraktionsmittel gedient hatte.

Weiterhin zerstörte Zink in autooxydierten Tinkturen die Peroxyde durch längeres Erhitzen am Rückflusskühler, oder insbesondere durch Eindampfen. Auch derart behandelte Guajakauszüge gaben nach Zusatz von Wassersfoffsuperoxyd mit Rohmilch die Reaktion; nach mehrtägigem Stehen nahmen diese Tinkturen wieder selbständig die Reaktionsfähigkeit an.

---

[1]) Bourquelot. n. Oppenheimer „Die Fermente" Leipzig 1900. S. 292,

[2]) Neumann-Wender. Chem. Ztg. Cöthen 1902. No. 102 u. Oesterr. Chem. Ztg. 1902, No. 1; cfr. auch Molk.-Zeitung Berlin 1903, 62.

[3]) Carnot, Bourquelot in Oppenheimer „Die Fermente" Leipzig 1900.

[4]) Zink hat das Wasserstoffsuperoxyd nur bei der Guajakmischprobe versucht.



Gekochte oder auf 75 bis 80° erhitzte Milchproben erzeugten selbst nach stundenlangem Stehen keine Blaureaktion. In Mischmilch (gekochte mit roher) konnte Zink Zusätze von 10 % roher Milch ohne besondere Vorsichtsmassregeln schnell und deutlich nachweisen. Selbst bei Zusätzen von 5 % erhielt er noch deutliche Färbungen. Die Wasserstoffsuperoxyd-Guajakmischprobe gab ferner auch bei Serum, das teils durch freiwillige, teils durch künstliche Säuerung der Rohmilch gewonnen wurde, rasche und deutliche Reaktionen.

Da bereits bei einem Tinkturzusatz von 1 % innerhalb einiger Sekunden noch starke Bläuungen der Rohmilch erhalten wurden, während es dazu nach Ostertag 10 %, nach Kühnau 6,6 % Tinkturzusatzes bedürfe, findet Zink die Mischprobe mit Wasserstoffsuperoxyd der Arnold-Ostertag'schen Mischmethode weit überlegen.

Bezüglich der Einflüsse, welche die Menge des zugesetzten Wasserstoffsuperoxydes und seine Konzentration auf die Guajakbläuung, insbesondere auf die Schnelligkeit des Eintrittes derselben ausübte, bemerkt Zink folgendes:

Der Zusatz eines Tropfens sehr verdünnter Wasserstoffsuperoxydlösung (käufliches medizinisches wurde immer um das 10-fache verdünnt) bewirkte Blaufärbung sofort oder innerhalb 1 Minute.

Beim Zusatze eines Tropfens ca. 1 %iger, noch mehr von einer 3%igen Wasserstoffsuperoxydlösung machte sich eine gewisse Reaktionsträgheit bemerkbar, welche annähernd im umgekehrten Verhältnisse zum Tinkturzusatze stand.

Zusätze von 10 bis 30%igen Wasserstoffsuperoxydlösungen veranlassten zwar eine noch erheblichere Verzögerung der Reaktion. Dieselbe war aber nicht mehr im gleichen Verhältnisse zur Konzentration des Wasserstoffsuperoxydes bezw. zum Tinkturzusatze.

Bei dem Gebrauche 30%iger Wasserstoffsuperoxydlösung trat starke Gasentwickelung ein. Es bildete sich an der Oberfläche der Milch eine Schaumdecke, welche sich allmählich von der Flüssigkeit absonderte und zuerst die Blaufärbung annahm. Zink bemerkt dazu, dass infolge der starken Sauerstoffentwickelung und der Heftigkeit der eingeleiteten Oxydation sich hierbei Nebenprozesse abspielen dürften, welche komplizierend auf die Bildung des Guajakonsäureozonids einwirkten.

Bezüglich der Haltbarkeit der durch Wasserstoffsuperoxyd hervorgerufenen Färbungen ergab sich, dass bei geringerem Wasserstoffsuperoxydgehalt die entstandene Bläuung auch meist von geringerer Dauer war, während bei höherem Gehalt an Wasserstoffsuperoxyd die Reaktion zwar später entstand, aber dafür länger anhielt.

Neben der Höhe des Tinkturzusatzes und dem Wasserstoffsuperoxydgehalt üben nach Zink auch die individuellen Eigenschaften der jeweiligen Milch einen massgebenden Einfluss auf die Schnelligkeit und die Intensität der Blaufärbung aus. Starke Reaktionsverzögerungen wären meist durch Zusatz eines weiteren Tropfens Wasserstoffsuperoxyd sowie gelindes Erwärmen der Milch auf ca. 30 bis 40° zu beseitigen. Helfe auch dieses Mittel nicht, müsse man eben den Eintritt der Reaktion aus sich selbst abwarten. Letzterer zeige sich in längerer oder kürzerer Zeit bestimmt.

Zink hat auch die Wirkung des Terpentinöls und des Lavendelöls auf die Guajakreaktion geprüft. Bei der Ringprobe entstand auf Zusatz eines Tropfens der genannten Oele mit an und für sich nicht reaktionsfähigen Tinkturen eine schöne, lange anhaltende Blaufärbung. Dagegen liess sich bei dem Mischverfahren eine bemerkenswerte Beeinflussung nicht erkennen.

Auf Grund seiner Ergebnisse erklärt Zink die Anwendung von Wasserstoffsuperoxyd als zum Wesen der Guajakreaktion gehörig und gibt demgemäss für diese folgende Leitsätze:

1. Der Zusatz einiger Tropfen einer sehr verdünnten Wasserstoffsuperoxydlösung bewirkt bei ungekochter Milch mit frisch bereiteter oder an und für sich nicht reaktionsfähiger Guajaktinktur eine deutliche Blaufärbung. Bei Anwendung bereits aktiver Guajaktinktur wird eine wesentlich höhere Empfindlichkeit und eine intensivere, länger haltbare Färbung erzielt, als dies ohne den Zusatz von Wasserstoffsuperoxyd sein würde. In gekochter Milch erfolgt auch nach stundenlangem Stehen keine Blaufärbung.

2. Empfehlenswert ist es, die Reaktion als Zonenprobe auszuführen, da sich bei dem Mischverfahren zuweilen eine gewisse Reaktionsträgheit bemerkbar macht, deren Ursache noch nicht völlig aufgeklärt ist. Der Zusatz aetherischer Oele ist bei der Mischprobe nur von geringer Bedeutung.

Siegfeld,[1]) welcher 1901 die Guajakreaktion als brauchbar hingestellt hatte, verwirft sie im Jahre 1903 wieder. Gegen ihre Anwendung spräche einmal die von einer Reihe von Autoren festgestellte Unzuverlässigkeit der käuflichen Tinkturen, ferner die Ungleichmässigkeit des Ausgangsmaterials, vor allem aber die Tatsache, dass frisch bereitete Guajaktinkturen — auch Acetonauszüge — nicht zuverlässig brauchbar seien, sondern erst im Laufe mehrerer Tage durch Autooxydation reaktionsfähig würden. Auch lasse die Wirksamkeit mit der Zeit stark nach. So fand Siegfeld bei einer grösseren Zahl von Versuchen, dass ¼ Jahr alte Guajaktinktur ihre Reaktionsfähigkeit vollständig eingebüsst hatte. Durch Zusatz einer sehr geringen Menge Wasserstoffsuperoxyd neben der Guajaktinktur lasse sich ein Teil dieser Uebelstände heben; durch höhere Gaben von dem Oxydationsmittel werde dagegen die Reaktion stark beeinträchtigt.

Rullmann[2]) erklärt: Mittelst der Guajak-Wasserstoffsuperoxydreaktion ist man sehr gut imstande zu unterscheiden, ob eine Milch nur auf 68 resp. kurze Zeit auf höchstens 70°, oder eine Stunde lang auf 69 bis 70° erhitzt wurde. Denn in dem ersteren Falle tritt mit dem Reagens ein deutlich blauer Ring auf, während bei Milch, welche längere Zeit auf 69 bis 70° erhitzt war, selbst nach einer Stunde keine Reaktion erfolgt. Die Reaktion kann man bedeutend verschärfen, wenn man die Milch 2 bis 3 Minuten in ein Wasserbad von 25 bis 30° eintaucht.

von Stallie[3]) hält die Probe auf rohe und gekochte Milch mittelst Guajaktinktur für unzuverlässig.

[1]) Siegfeld. Milch-Ztg. 1901, 723; Molkerei-Zeitung Hildesheim 1903, 792 (n. Zeitschr. f. angew. Chemie 1903, No. 32.)

[2]) Rullmann. Molk. Ztg. Berlin 1904, 137 (nach Zeitschr. f. Untersuchung d. Nahr. u. Genussmittel 1904, 7, 810).

[3]) von Stallie. Pharm. Weekblad 40, 1103. cit. n. Milchw. Zentralbl. 1905, Heft 7.

Anhang.

Merck[1]) empfiehlt als ausserordentlich empfindliches Reagens auf Oxydasen das Guajacin. Dasselbe ist ein nach einem besonderen, von Prof. Schmidt in Lille gefundenen Verfahren aus Guajakholz dargestellter Körper,[2]) welcher durch oxydierende bezw. katalysierende Substanzen blau gefärbt wird. Das Guajacin soll bedeutend empfindlicher sein als das Guajakharz und wird von Bertrand[3]) als das beste Reagens auf Oxydasen angesehen. Zur Ausführung der Reaktion bedient man sich einer 5%-igen alkoholischen Lösung, welche sich in schwarzen, vollständig angefüllten, gut verschlossenen Flaschen sehr gut halten soll.

Weiterhin ist von Schaer[4]) angeregt worden, statt der alkoholischen Lösung des Guajakharzes (oder auch der Guajakonsäure) eine Guajakharz-Chloroformlösung anzuwenden. Diese gebe viel schärfere Reaktionen, da sie sich nach dem Schütteln wieder abscheide. Insbesondere empfiehlt Schaer, bei der Milchprüfung Versuche mit 1 %-iger Guajakharz- (oder 0,5%iger Guajakonsäure —) Chloroformlösung zu machen. Die auftretende Blaufärbung gehe in das Chloroform über.

Utz[5]) prüfte sowohl das Guajacin wie die von Schaer vorgeschlagenen Reagentien auf ihre Brauchbarkeit. Hinsichtlich des ersteren fand er, dass frische alkoholische Guajacinlösungen mit roher Milch keine Reaktion gaben, auch nicht beim Zusatz von Wasserstoffsuperoxyd. Sie riefen vielmehr erst mit zunehmendem Alter, nachdem sie längere Zeit und nur mit Watte verschlossen am Licht gestanden hatten, mit roher Milch und zwar auch ohne Wasserstoffsuperoxydzusatz eine schöne hellbraune, rasch an Intensität zunehmende Färbung hervor. Guajacin-Acetonlösungen erzeugten ebenfalls ohne Wasserstoffsuperoxyd in ungekochter Milch eine zunächst grünlich-blaue Färbung, die rasch in dunkelblau und zuletzt in violett überging. Nach Utz ist die Reaktion mit Guajacin, namentlich in Aceton, auch sehr deutlich. Die Guajacinlösungen hätten aber den Fehler, nach frischer Herstellung nicht sofort gebrauchsfähig zu sein.

In der von Schaer vorgeschlagenen Modifikation des Guajakverfahrens kann Utz irgend welche Vorteile nicht erblicken. Bei seinen Versuchen gab eine frische Lösung von Guajakharz in Chloroform keine Reaktion. Bei einer frischen Lösung von „Guajacin in Chloroform" färbte sich die Milch sehr langsam hellblau. Die Chloroformschicht schied sich allmählich unten, braun gefärbt, ab; später entstand an der Berührungsstelle zwischen Milch und Reagens ein etwa ½ cm breiter blauer Ring. Utz erklärt, dass sich das chloroformhaltige Reagens viel zu langsam abscheide und dadurch die Beobachtungsdauer unnötig verlängert werde.

---

[1]) Merck's Index. cit n. Utz. Milchzeitung 1903, No. 38.
[2]) Merck's Jahresbericht XVI. 1902. S. 75. cit. n. Utz. Milchzeitung 1903, No. 38.
[3]) Agenda du Chimiste 1897, S. 550. cit. n. Utz, Milchzeitnng 1903, No. 38.
[4]) Schaer, D. Chem. Ztg. 1903, S. 616. cit n. Utz. Milchzeitung 1903, No. 38.
[5]) Utz. cit. n. Milchzeitung 1903, No. 38.

2. Die Storch'sche Paraphenylendiaminprobe.

Babcock[1]) fand, dass jede ungekochte Milch die Fähigkeit besitzt, Wasserstoffsuperoxyd unter Abscheidung von Sauerstoff zu zerspalten (die Ursache erblickte er damals in dem die Fettkügelchen umgebenden Fibrin) ferner, dass Rahm sich dabei aktiver als Vollmilch und diese sich wieder aktiver als Magermilch verhält. Storch[2]) stellte fest, dass die katalytische Fähigkeit sich bei Milch von jedem Zeitpunkte der Laktationsperiode vorfindet, jedoch bereits beim Erhitzen auf 80° verloren geht. Und zwar gilt diese Temperautr im besonderen gleichmässig für frische und abgerahmte Milch, Rahm, Molke und Butter, während Buttermilch bereits nach dem Erwärmen auf 71° nicht mehr imstande ist, Wasserstoffsuperoxyd zu zersetzen. In Erkenung der Tatsache, dass durch Reagentien und Wasserstoffsuperoxyd erzeugte Farbenreaktionen ausbleiben müssten, wenn die Milch auf genannte Temperatur gebracht oder aufgekocht werde, prüfte er als geeignet erscheinende Substanzen das Jodkalium, ferner das Guajakol, Hydrochinon, Pyrokatechin, α -Naphtol, Eikonogen, Amidol, Metol und Paraphenylendiamin auf ihre Brauchbarkeit zur Unterscheidung roher und erhitzter Milch. Jedoch nur die letztgenannte Substanz fand er für den genannten Zweck als hinreichend empfindlich und praktisch. Schüttelt man nämlich einige ccm. (ca. 1 Teelöffel voll genügt) unerhitzte Milch, welche man vorher mit einem Tropfen verdünnter Wasserstoffsuperoxydlösung versetzt, mit 2 Tropfen 2 %-iger Paraphenylendiaminlösung, so entsteht sofort eine graublaue Färbung, die rasch intensiv wird.

Zur Ausführung der Probe sind nach Storch erforderlich:

1. Reagensgläser. Am geeignetsten sollen solche von etwa 13 cm Länge und 12 cm Weite sein.

2. Eine 2%ige Paraphenylendiaminlösung. Diese wird durch Auflösen von 1 g Paraphenylendiamin in 50 ccm warmem destilliertem Wasser hergestellt, dann durch ein Papierfilter in eine braune Tropfzählflasche gegossen und an kühlem Orte aufbewahrt. Sie nimmt allmählich dunklere Färbung an und ist nach 2 Monaten nicht mehr brauchbar.

Die zu ihrer Anfertigung dienende Paraphenylendiaminsubstanz ist, wenn sie in trockenem Zustande in verschlossenem Glase und an trockenem Orte aufgehoben wird, von kaum begrenzter Haltbarkeit. Der Preis beträgt ca. 5 M. für 100 g., demnach für 50 ccm einer 2 %-igen Lösung 5 Pfg. Letztere reicht, da 2 Tropfen davon für 5 ccm Milch genügen, für mindestens 400 Milchproben.

3. Eine Wasserstoffsuperoxydlösung: Käufliches Wasserstoffsuperoxyd wird, wenn es 1 % des Stoffes enthält, mit einem fünffachen Volumen dest. Wassers verdünnt und eine sehr geringe Menge Schwefelsäure dazu getan (1 ccm konzentrierte auf 1 l Wasser). Diese Wasserstoffsuperoxydlösung hält sich in brauner Tropfzählflasche gut.

---

[1]) Babcock. Ann. rep. of the Agr. Exp. Stat. Univ. Wisconsin 1889, 63. cit. n. Siegfeld, Milchztg. 1901. No. 46; cf. auch Ref. Milchztg. 1898, 347 (Storch) sowie 1899, 487 (Barthel).

[2]) Storch, Milchztg. 1898, 347. Molk.-Ztg. Berlin 1898, 285 u 1899, 540. Centralbl. f. Agrik. Chemie 1898, 711.

Färben sich bei Ausführung der Probe Vollmilch, Magermilch oder Rahm intensiv blau (indigo) bezw. Molke violett-rotbraun, so hat eine Erhitzung auf 78° überhaupt nicht stattgefunden. Wird die Milch deutlich sofort oder nach ½ Minute blaugrau gefärbt, so ist sie mit 79 bis 80° erwärmt. Behält die Milch (Rahm) ihre weisse Farbe bei, oder tritt nur ein schwach violett-roter Farbenton auf, so ist sie mit mehr als 80° erhitzt worden. Saure Buttermilch ist vor der Probe mit ca. der halben Menge klaren Kalkwassers (auf 1 Teelöffel Milch ½ Teelöffel Kalkwasser) zu neutralisieren. Nimmt sie die Blaufärbung an, so stammt sie von Rahm, der nicht bis auf 80° erhitzt worden ist, während beim Fortbleiben der Färbung der Rahm auf 80° und darüber gebracht worden ist. Von Butter werden etwa 25 g in einem Becherglase, welches man in Wasser von höchstens 60° hält, geschmolzen, sodann das klare Butterfett von dem abgeschiedenen milchweissen Rückstand abgegossen und dieser mit dem gleichen Volumen Wasser vermischt. Sodann giesst man einen Teil des Gemisches ins Reagensglas, setzt die Reagentien hinzu und zieht die bei der Buttermilchprobe erwähnten Schlüsse.

Bei dem Versuch, den „aktiven Stoff" aus der Milch zu isolieren, gewann Storch einen Körper, der Wasserstoffsuperoxyd zerspaltete und sich auf Zusatz von Paraphenylendiamin violett-rotbraun färbte: also eine Substanz von enzymatischer Natur. Da ferner die Reaktion auch in der Molke violett-rotbraun (ohne jede blaue Nüance) eintrat, so schloss Storch, dass die in unveränderter Milch entstehende Blaufärbung eine Wirkung des Kaseïns sei.

Storch ermittelte endlich, dass (in Uebereinstimmung mit saurer Buttermilch) die sauerstoffabspaltende Fähigkeit der aktiven Substanz durch die freiwillige Säuerung der Milch verhindert wird. Nach Zusatz geringer Mengen Formaldehyd liess sich aber die Milch, selbst in gesäuertem Zustande, lange Zeit aufbewahren, ohne die Wasserstoffsuperoxyd zersetzende Wirkung gänzlich einzubüssen.

Storch hat als Indikator auch das Dimethylparaphenylendiamin[1]) geprüft. Nach ihm geben hiervon sowohl die Base als auch das Chlorhydrat der Milch eine prachtvoll violette Färbung. Er empfiehlt diese Stoffe aber nicht, weil sie 10 bezw. 5 mal teurer sind als das Paraphenylendiamin und scheinbar in Lösung leichter Sauerstoff aufnehmen.

In Anlehnung an die von Storch entdeckte Reaktion beschäftigte sich Barthel[2]) mit der Natur der inzwischen nach weiteren Untersuchungen Babcocks, Russels und Vivians[3]) unter dem Namen „Galaktase" bekannt gewordenen, Wasserstoffsuperoxyd zersetzenden Substanz. Barthel erklärt, dass die Storch'sche Reaktion auf die zahlreichen, jederzeit in der Milch vorhandenen, weissen Blutkörperchen und ein von diesen abgesondertes Enzym zurückzuführen sei. Diese hätten, ebenso wie andere protoplasmatische Substanzen, die Eigenschaft, Wasserstoffsuperoxyd zu zersetzen; das Gleiche gelte vom Blut-

---

[1]) Dimethylparaphenylendiamin, Milch-Zeitung 1902, 81.

[2]) Barthel „Die Bakteriologie des Meiereiwesens" Leipzig 1901 und Ref. Milchztg. 1899, 487.

[3]) Babcock, Russel. Vivian. „Anorgan. ferments of milk"-Wisconsin 1897, n. Utz, Milchztg. 1903, Nr. 9.

serum. Würden daher zu einer Milch, die bis auf 80° aufgewärmt worden sei und deshalb die Storch'sche Reaktion nicht mehr gebe, weisse Blutkörperchen oder Blutserum hinzugesetzt, so trete die Farbenerscheinung von neuem auf. Sie verschwinde aber wieder bei der Erhitzung auf 80°, weil alsdann die weissen Blutkörperchen zerstört würden. Babcock fand, dass die Galaktase durch Zusatz von Formalin, Phenol, Quecksilberchlorid zerstört wird. Barthel sah dasselbe bei den Leukocyten bezw. dem Blutserum bestätigt, indem die Reaktion ausblieb, wenn der über 80° erhitzten und sodann mit weissen Blutkörperchen oder Blutserum versetzten Milch zuvor Formalin, Phenol oder Quecksilberchlorid beigemischt worden war.

Eichloff[1]) beobachtete, dass in ungekochten mit Formalin (auch geringeren Mengen davon) conservierten Milchproben die Storch'sche Reaktion ausblieb, resp. sich in solcherMilch nur ein rötlicher Schimmer bemerkbar machte. Er nimmt an, dass der fermentartige Körper durch das Formalin nicht zerstört, sondern die Reaktion durch die reduzierende Wirkung dieses Aldehydes verhindert wird. In der Rötlichfärbung sieht Eichloff nur eine Reaktion zwischen dem Formalin und den Storch'schen Reagentien, da er mit Formalin und den letzteren auch bei Abwesenheit von Milch eine intensive rote Farbenerscheinung herbeiführen konnte. Bei forensischen Versuchen müsse man daher vorsichtig sein und neben der eigentlichen Reaktion noch eine Prüfung auf Formalin anstellen, vor allem aber dieses Konservierungsmittel für später zu untersuchende Milch vermeiden. Ferner mache auch das Sonnenlicht die dasWasserstoffsuperoxyd zersetzende Substanz unwirksam, und endlich scheine die gekochte Milch, wenn bei längerem Stehen derselben im Brutschranke den Sporen der Dauerformen Gelegenheit zum Auskeimen geboten worden sei, die Reaktionsfähigkeit wieder zu erlangen.

Anschliessend daran hat die Molkerei-Zeitung Berlin 1900, 469 mitgeteilt, dass in einer norddeutschen Molkerei die Storch'sche Probe aus nicht zu erkennenden Ursachen zeitweilig ganz versagte.

Siegfeld[2]) prüfte die Storch'sche Methode in der Weise nach, dass er ca. 10 ccm Milch mit 1 bis 2 Tropfen der medizinischen Wasserstoffsuperoxydlösung und 2 bis 3 Tropfen der 2 %-igen Paraphenylendiaminlösung durchschüttelte. Bei Rohmilch trat momentan eine Graublaufärbung ein, die in ½ bis ¾ Minute in tiefes Indigoblau überging. Erhitzt gewesene Milch blieb bei Anwendung einer frischen Paraphenylendiaminlösung rein weiss. Auch bei Mischmilch erwies sich das Verfahren sehr empfindlich, denn es gab ein Rohmilchzusatz von 10 % noch eine intensive, ein solcher von 5 % eine schwache, aber auch deutliche Reaktion. Auf Grund seiner Versuche erklärt Siegfeld die Storch'sche Methode unter allen von ihm geprüften[3]) resp. zur Zeit empfohlenen Verfahren als die praktisch brauchbarste. Für die Ausführung derselben teilt er noch folgende Beobachtungen und Verhaltungsmassregeln mit:

---

[1]) Eichloff, Molkerei-Zeitung, Berlin, 1900, 271 und 469.
[2]) Siegfeld. Milchztg. 1901, Nr. 46; desgl. Molk.-Ztg. Hildesheim 1903, 792 (n. Zeitschr. f. angew. Chemie, 1903 No. 32).
[3]) cf. Tabelle B. S. 43.

„Unter dem Einflusse des Lichtes und der Luft trat auch bei erhitzten Milchproben allmählich eine Blaufärbung ein. Diese wurde jedoch erst nach einigen Stunden einigermassen intensiv und kann somit nicht zur Verwechslung mit der eigentlichen Reaktion führen.

Das Paraphenylendiamin ist schon in Substanz nicht beständig, rasch zersetzlich aber in Lösungen. Diese geben in vorgeschrittenem Alter auch mit gekochter Milch Verfärbungen, welche dem Ungeübten die Reaktion vortäuschen können. Die Lösung darf daher nicht über 2 bis 3 Monate alt werden. Das feste Präparat ist ebenfalls von Zeit zu Zeit zu erneuern und nur in frischem, höchstens schwachgefärbtem Zustande zu beziehen.

Säuren oder Alkalien im Ueberschuss verhindern den Eintritt der Reaktion. Natürliche Säuerung der Milch schwächt je nach ihrer Stärke die Blaufärbung bis zur Unkenntlichkeit ab. Durch Zusatz verdünnter Alkalien wieder normal gemacht, verhält sich solche Milch dann auch der Storch'schen Probe gegenüber wieder normal.

Von Konservierungsmitteln ruft Kaliumbichromat — als oxydierender Körper — auch in erhitzter Milch die Reaktion hervor. Wasserstoffsuperoxyd hält letztere in Rohmilch auf. In mit Formalin — als reduzierendem Körper — conservierten Milchproben wird die Blaureaktion abgeschwächt. Für spätere Prüfung aufgehobene Milch ist durch verdünnte Alkalien wieder normal zu machen oder höchstens mit Formalin zu konservieren."

Siegfeld rät, die Milch auf mindestens 85° zu erhitzen, da die gebräuchlichen Milcherhitzer die Temperatur von 80° nur für wenige Augenblicke erreichten.

Utz[1]) empfiehlt die Schaffer'sche[2]) Modifikation der Paraphenylendiaminprobe, wonach 10 ccm Milch mit 1 Tropfen 0,2 %-igem Wasserstoffsuperoxyd und 2 Tropfen 2 %iger Paraphenylendiaminlösung umzuschütteln sind. Seine Befunde bei Rohmilch gleichen den bisher erwähnten. Bei Magermilch ist die Reaktion am schönsten, bei Rahm mehr graublau und bei Serum, wo sie recht langsam kommt, mehr rot-violett. Ueberschüsse von Säuren bei der Serumbereitung verhindern die Reaktion. Saure Milch ist vor der Probe mit Kalkwasser zu neutralisieren. Kleine Mengen von Formaldehyd verzögern die Reaktion; grössere sind imstande, dieselbe völlig aufzuheben, jedoch stets schon durch den Geruch erkennbar.

Nach du Roi und Koehler[3]) hat sich die Storch'sche Methode am besten bewährt. Das Paraphenylendiamin sei aber nicht lange haltbar, teuer und nicht überall erhältlich.

Weber[4]) hat mit der Paraphenylendiaminreaktion umfangreiche Versuche angestellt. Nach seinen Angaben wird jede durch Erhitzung inaktivierte, d. h. auf ca. 80° gebrachte Milch durch die Storch'schen Reagentien zunächst nicht verändert. Jedoch tadelt Versuchsansteller, dass der bei längerem Stehen der erhitzten Milchproben sich bemerkbar machende violette Schimmer in dem Zeitpunkte des Erscheinens zu sehr

---

[1]) Utz. Pharm, Centralhalle 1901, 149.
[2]) Schaffer. Schweiz. Wochenschr. f. Chem. u. Pharm. 1900, 15.
[3]) du Roi-Koehler. Milchztg. 1902, Nr. 2.
[4]) Weber. Dissertation Leipzig 1902.

wechsele. Wie aus dem Bericht hervorgeht, zeigte sich diese Verfärbung zwischen 90 Sekunden bis 3 Stunden, in den meisten Fällen nach 1 Stunde, und nahm dementsprechend früher oder später (bei 5 Minuten bereits nach 1 Stunde, bei 60 Minuten erst innerhalb ca. 6 Stunden) allmählich die intensive Blaufärbung der Rohmilch an.

In verschieden hohem Alter geprüfte Milch hat Weber nie mit Alkalien versetzt, denn er erklärt, dass durch die zunehmende Säuerung die Intensität sowie die Haltbarkeit der Storch'schen Reaktion beeinträchtigt werde, und dass 60 bis 80 Stunden alte Rohmilch nur noch undeutlich oder garnicht zu erkennen sei. In ähnlicher Weise bleibe der für erhitzte süsse Milch spezifische violette Schimmer aus, wenn diese 60 bis 80 Stunden gestanden habe, weil in dieser Zeit ihre Säuerung beginne. Rohe sowie frisch erhitzt gewesene Milch sei demnach in diesem gleichen Alter durch die Storch'sche Reaktion nicht mehr einwandsfrei oder überhaupt nicht zu unterscheiden.

Auf Grund von Paralellversuchen schlägt Weber an Stelle des Storch'schen das käufliche Wasserstoffsuperoxyd vor. Durch diese Abänderung werde

a. die Unterscheidung zwischen roher (sehr bald tief dunkelviolett werdender) und gekochter süsser Milch innerhalb der für die Praxis in Betracht kommenden Beobachtungszeit von 2 Minuten intensiver;

b. die Reaktion in säuernder, nicht über 60 Stunden alter Rohmilch schneller und deutlicher;

c. der Eintritt der Verfärbung bei genügend erhitzter Milch auf engere Zeiträume, etwa 4 bis 60 Minuten eingeschränkt.

10%, sowie jeder höhere Zusatz roher zur gekochten Milch ist nach Weber schnell und sicher zu erweisen, und mit gleich günstigem Erfolge das Verfahren auch für Magermilch, Eismilch nach dem Auftauen sowie Kolostralmilch brauchbar. Für Molke kann der Versuchsansteller weder die Storch'sche noch die abgeänderte Methode empfehlen, indem die Unterschiede zwischen roher und gekochter Molke zu unsicher hervorträten.

Aus den bei konservierter Milch mit der abgeänderten Probe erhaltenen Befunden sei kurz folgendes angeführt:

1. Wasserstoffsuperoxyd hatte selbst in starken Gaben (10 Tropfen auf 50 ccm Milch) keinen Einfluss auf die beobachteten Erscheinungen.
2. Formalin bewirkte
   a. bei roher Milch sowohl in starkem (2 Tropfen auf 50 ccm Milch) als auch in schwachem (1 Tropfen auf 100 ccm) Zusatze eine Abnahme in der Intensität der immerhin deutlichen Reaktion;
   b. bei erhitzter Milch einen früheren Eintritt des violetten Scheines, welcher bei der starken wie der schwachen Gabe sich gleich schnell (nach 1 Minute) bemerkbar machte. Auch ging die Verfärbung dementsprechend früher, bei der schwachen Formalingabe nach 10 Minuten, in ausgesprochenes Violett über.

Formalinzusätze haben nach Weber keine Bedeutung für die Praxis der Reaktion, da er bei erhitzter Milch ohne Formalinzusatz niemals eine Färbung nach 4 Minuten konstatieren konnte.

3. Chromsäure, die an sich die Milch gelb färbt, gab
   a. in starken Zusätzen (5 Tropfen auf 100 ccm) keinen Unterschied zwischen roher und gekochter Milch. Die sofort entstandenen dunkelgelbgrünen (Rohmilch) und gelbgrünen (erhitzte) Färbungen waren nach 5 Minuten durch tiefdunkel- bezw. dunkelblaugrün beide in dunkelgraubraun übergegangen;
   b. in schwachen Zusätzen (1 Tropfen auf 100 ccm) bei Rohmilch sofort tiefdunkelviolette Reaktion, während erhitzte zunächst unverändert blieb, aber nach 3 bis 7 Minuten eine matt- bezw. hellviolette Färbung angenommen hatte.
4. Kaliumbichromat verlieh der Milch im Zusatze von 0,01 g auf 100 ccm ein gelbliches Aussehen und der Reaktion im wesentlichen den nämlichen Verlauf wie der schwache Chromsäurezusatz.
5. Borsäure beeinflusste die Reaktion selbst in starker Gabe nicht.
6. Salicylsäure rief in starkem Zusatze eine weniger intensive Färbung der Rohmilch hervor. Schwache Zusätze hatten eine nur unwesentliche, und bei erhitzter Milch das Konservierungsmittel keinerlei Wirkung.
7. Benzoesäure beeinträchtigte die Probe bei erhitzter Milch nicht; bei roher wurde die Reaktion weniger schnell intensiv.
8. Natriumcarbonat und Natriumbicarbonat störten in schwachem Zusatze die Rohmilchuntersuchung nicht. Nach starker Gabe war eine geringfügige Verminderung der Farbenintensität sowie ein besonderes Hervortreten des roten Farbentones festzustellen. Bei erhitzter Milch liess sich nichts beobachten.
9. Von phosphorigsaurem Natron wirkten starke (0,5 g auf 100 ccm Milch) sowie schwächere Mengen auf die Methode nicht ein.
10. Unterphosphorigsaures Natron beeinträchtigte in schwachem Zusatz die Rohmilchreaktion nicht, in starkem (0,5 g auf 100 ccm) liess es eine äusserst geringe Verzögerung derselben bemerken. In gekochter Milch zeigte sich bei der Probe keine Einwirkung.
11. Schwefligsaures Natron:
    a. starker Zusatz (0,5 g auf 100 ccm) rief kurze Zeit nach der Konservierungsvornahme bei roher Milch nur eine matt rotviolette oder gar keine Färbung hervor; einige Zeit später fiel die Reaktion etwas intensiver aus;
    b. bei schwachem Zusatz (0,1 g auf 100 ccm) wurde die Reaktion schnell deutlich, erreichte aber das Maximum der Färbung erst in 10 Minuten.

    Bei erhitzter Milch bewirkte sowohl der starke wie auch der schwache Zusatz des Konservierungsmittels eine wesentliche Verzögerung der Verfärbung, welche selbst nach 30 Minuten sich noch nicht zeigte.
12. Unterschwefligsaures Natron:
    starke (0,5 g pro 100 ccm) wie schwache Mengen beeinflussten die Rohmilchreaktion so gut wie nicht. In erhitzter Milch war der violette Schein nach 30 Minuten noch nicht eingetreten.

Weber erklärt, dass der geringe Zusatz von Konservierungsmitteln, wie sie die Praxis des Milchverkehrs ohne Schädigung des Geschmackes und des Aussehens der Milch nur anwenden könne, die abgeänderte Storch'sche Methode nicht beeinflussen. Wenn aber beim Zurückstellen beanstandeter Milch zur späteren Prüfung starke Zusätze gegeben werden müssten, so seien schwefligsaures Natron, Chromsäure und Kaliumbichromat auszuschalten. —

1902 schreibt Storch[1]), dass sein Verfahren mit 2%iger Paraphenylendiamin- und 0,2%iger Wasserstoffsuperoxydlösung in Dänemark zur vollen Befriedigung angewandt werde. Die Methode sei derart scharf, dass eine der gesamten Milch entnommene Probe binnen kurzem sich bläue, wenn auch nur $^1/_{10}$ der Milch die Temperatur von 78° noch nicht überschritten habe. Deshalb wären die Meiereien gezwungen, die Temperatur in mangelhaft arbeitenden Pasteurisierapparaten einige Grade über 80° hinauszuhalten.

In ähnlicher Weise spricht sich die chemische Abteilung des dänischen Versuchslaboratoriums in ihrem Bericht pro 1903/04 über die Durchführung des Pasteurisierzwanges in Dänemark aus. Sie erklärt, dass die zur Untersuchung der von den Polizeibeamten entnommenen Kontrollproben an Magermilch, Buttermilch, Rahm und Butter benutzte Storch'sche Methode sich als durchaus zuverlässig erwiesen habe, und dass sich hinsichtlich ihrer Brauchbarkeit schon reichliche Erfahrungen gesammelt hätten, indem das Verfahren 5 Jahre hindurch nicht nur vom Laboratorium, sondern auch von der Butter- und Margarinekontrolle angewandt worden sei. Nur in einzelnen Fällen, wenn die Milch nicht 80° erreicht habe, könne die Blaufärbung so schwach ausfallen, dass sich ihr Eintritt schwer erkennen lasse. Ebenso könne ein nicht voll auf 80° erwärmter, also noch reaktionsfähiger Rahm seinen geringen Grad von Reaktionsvermögen verloren haben, wenn er infolge langen Stehens (besonders in der warmen Jahreszeit) in Säuerung übergegangen sei.

Rullmann[2]) erklärt, dass das Storch'sche Reagens in salzsaurer Beschaffenheit vorzügliche Dienste leistet, wenn man eine sogenannte Schichtenreaktion[3]) ausführt, d. h. wenn 10 ccm Milch mit 10 Tropfen 3%igem Wasserstoffsuperoxyd vermischt und sodann mit 1 ccm Paraphenylendiaminchlorhydratlösung überschichtet werden.

von Stallie[4]) hält die Storch'sche Probe für absolut zuverlässig.

3. Die Ursolprobe von Utz.

Chlopin[5]) befand den von der Aktiengesellschaft für Anilinfabrikation in Berlin SO. in den Handel gebrachten Teerfarbstoff Ursol D — vornehmlich in der Form von Ursolreagenspapier — als ein

---

[1]) Storch. Milchztg. 1902, 81.

[2]) Rullmann. Ueber die Reaktionen des oxydierenden Enzymes in der Kuh- und Frauenmilch. Osterr. Chem. Ztg. 1904, nach Molk.-Ztg. Berlin 1904, 137.

[3]) Auch Weber hat die Paraphenylendiaminprobe als Zonenreaktion versucht und als unbrauchbar verworfen. Anm. d. Verf.

[4]) Pharm. Weekblad, 40, 1103; n. Milchw. Centralbl. 1905, II. 7.

[5]) Chlopin. Zeitschr. f. Unters. d. Nahr. u. Genussmittel 1902, 504 cit. nach Chem.-Ztg. Cöthen 1902 u. Pharm. Centralhalle.

vorzügliches Mittel zum Nachweis von Ozon und stellte fest, dass das Ursolpapier beim Tauchen in reines Wasserstoffsuperoxyd keine Veränderung erfährt.

Utz[1]) prüfte das Ursol D auf seine Brauchbarkeit zur Unterscheidung von roher und gekochter Milch und findet es für diesen Zweck von ähnlicher Schärfe wie das Storch'sche Paraphenylendiamin. Zur Ausführung des Verfahrens sind erforderlich:

1. eine Lösung von 0,1 g Ursol D in 30 ccm absolutem Alkohol,
2. eine Mischung von 3 ccm Wasserstoffsuperoxyd (30 %) mit 97 ccm destilliertem Wasser.

Unter Benutzung genannter Ursollösung stellte Utz zunächst fest, dass diese mit Wasserstoffsuperoxyd (30 %) dunkelviolette und mit verdünnten Wasserstoffsuperoxydlösungen heller blaue Färbungen gibt, die allerdings nicht sofort, sondern nach längerer Zeit eintreten, während mit der Mischung von 3 ccm Wasserstoffsuperoxyd (30 %) und 97 ccm Wasser keine Färbung entstand.

Schüttelt man hingegen in einem Reagensglase ca. 2 ccm Milch mit ½ ccm Utz'schem Wasserstoffsuperoxyd und wenigen (3 bis 4) Tropfen Ursollösung, so tritt bei unerhitzter Milch sofort Blaufärbung ein. Diese zeigt sich noch ganz deutlich bei Proben, die bis auf 70° erhitzt worden sind, bleibt hingegen bei auf 80° pasteurisierter sowie jeder gekochten Milch aus, resp. eine solche Milch rein weiss. Auch bei Zusätzen von 10 % roher zur genügend erhitzten Milch ist die Reaktion noch kräftig, desgleichen bei 5 % Rohmilchzusatz sehr deutlich; hingegen tritt bei 2 % die Blaufärbung bereits ziemlich langsam, wenn auch noch zuverlässig ein. Saure Milch ist bis auf 7 Säuregrade (nach Soxhlet) zu neutralisieren; dann erfolgt auch hier die Reaktion rasch und deutlich. Ferner gibt nach Utz' Versuchen auch das Serum, ganz gleich ob dieses durch Versetzen der Milch mit verdünnter Essigsäure und schwaches Erwärmen (ca 40°) oder auch durch freiwilliges Gerinnen der Milch bereitet wird, die Reaktion sehr schön. Kleinere Mengen von Formaldehyd beeinträchtigen die Blaufärbung nicht, grössere können sie verzögern oder ganz unterdrücken. Auch Kaliumbichromat stört nicht.

Einen Fehler teilt jedoch nach Utz die Ursollösung mit dem Storch'schen Reagens, nämlich die geringe Haltbarkeit; denn es gaben verhältnismässig nicht zu alte Lösungen mit Rohmilch selbst dann keine Reaktion mehr, wenn konzentrierteres Wasserstoffsuperoxyd verwendet wurde.

Zur Vermeidung dieses Uebelstandes empfiehlt Utz das Reagens in Form von Tabletten, die aus einer Mischung von Ursol D und einem indifferenten Bindemittel (Milchzucker) hergestellt werden. Jeweils 1 Stück der Tabletten wird in warmem Wasser gelöst, hierauf das Wasserstoffsuperoxyd und einige ccm der zu untersuchenden Milch zugesetzt und durch kräftiges Schütteln die Reaktion eingeleitet. Die Ursoltabletten sind, wenn sie in einem dunklen gut verschlossenen Glase aufbewahrt werden, unbegrenzt haltbar, die Ausführung der Reaktion

[1]) Utz. Chem.-Ztg. Cöthen 1902, 1124; cf. auch Milchztg. 1902, 803.

mittelst derselben sicher. Durch weitere Versuche gelang es Utz[1]), auch das Wasserstoffsuperoxyd als Tabletten in feste Form zu bringen. Utz prüfte dazu folgende Superoxyde mit dem hier angegebenen Resultate:

1. Natriumsuperoxyd erwies sich als unbrauchbar, weil das bei seinem Zusatze zur Flüssigkeit sich entwickelnde Natriumhydroxyd das Zustandekommen der Reaktion direkt verhindert. Die alkalisch werdende Rohmilch gibt nämlich statt der blauen eine matt scharlachrote Farbe.
2. Der Zweck wurde dagegen erreicht mit einer Mischung von Baryumsuperoxyd und Kaliumbisulfat. Denn es bildet sich das gewünschte Wasserstoffsuperoxyd nach der Gleichung

$$BaO_2 + 2KHSO_4 = BaSO_4 + K_2SO_4 + H_2 O_2.$$

3. Auch eine Mischung von Kaliumperkarbonat und einem indifferenten Stoffe erwies sich als brauchbar, entsprechend der Gleichung

$$K_2 C_2 O_6 + 2H_2SO_4 = 2KHSO_4 + 2CO_2 + H_2O_2.$$

Utz hat hierbei $H_2 SO_4$ in die Reaktionsgleichung gesetzt. Es genügen nach ihm jedoch die in der Milch stets vorhandenen geringen Mengen von freier Säure, um aus dem Präparat eine entsprechende Quantität Wasserstoffsuperoxyd frei zu machen. Das von der Aluminiumgesellschaft Neuhausen in hoher Reinheit hergestellte Kaliumperkarbonat ist bei trockener Aufbewahrung dauernd haltbar; das Handelsprodukt ist 80%ig und enthält nur geringe Spuren von Chlorid und Sulfat als Verunreinigung.

4. Als noch brauchbarer befand Utz eine Mischung von Ammoniumpersulfat mit einem indifferenten Bindemittel in Tabletten, welches bei der Verflüssigung wohl im Sinne der Gleichung (Lauterwald)

$$(NH_4)_2S_2O_8 + 2H_2O = 2NH_4. H. SO_4 + H_2O_2$$

reagiert.

Utz bevorzugt daher das Ammoniumpersulfat und empfiehlt zum Nachweise der unerhitzten Milch Ursol- und Ammoniumpersulfattabletten. Die Ammoniumpersulfattabletten sind längere Zeit haltbar und anwendungsfähig, wenn man vollständig trockene Chemikalien zu ihrer Herstellung verwendet. Denn, während das Ammoniumpersulfat in vollkommen trockenem Zustande selbst bei 100° C. beständig ist, zersetzt es sich in feuchtem schon bei gewöhnlicher Temperatur unter Abgabe von stark ozonisiertem Sauerstoff. Bei der Herstellung der Tabletten sind genauestens bestimmte Mengenverhältnisse einzuhalten, da sonst (ähnlich wie bei zu konzentrierter Wasserstoffsuperoxydlösung) bereits beim Vermischen von Ammoniumpersulfat und Ursol D allein Blaufärbung eintreten und die schwersten Täuschungen herbeiführen kann, wenn der Gehalt an genannten Stoffen zu gross ist. Man löst daher zweckmässig zunächst je eine Tablette mit Ursol D und Ammoniumpersulfat in einem Reagensglase mit etwas Wasser auf. Tritt Blaufärbung ein, so ist der Gehalt an Ammoniumpersulfat zu hoch, und man nimmt ½ oder ¼ etc. Tablette zur Milchreaktion.

---

[1]) Utz. Milchztg. 1903, 291 und 262 (Lauterwald), desgl. Chem.-Ztg. Cöthen 1903, 300.

R. W. Raudnitz[1]) — Prag hatte inzwischen darauf hingewiesen, dass durch Rhodansalze die Oxydasereaktion gehemmt werde (schon beim Zusatz von 1 g Rhodanammonium — also für ½ Pfg. — auf 10 l Milch), mithin keine Wirkung auf Peroxyde entsteht und sich rohe Milch wie gekochte verhält. Utz setzte 10 % von einer Lösung von 8 g Rhodanammonium auf 1 l Wasser der ungekochten Milch zu und prüfte diese zunächst mit dem Storch'schen Verfahren. Es trat nach dem Schütteln vorerst gelbgrüne Färbung ein, die allmählich verschwand, um einem rein weissen Aussehen, wie bei gekochter Milch, Platz zu machen. Bei der Ursolprobe dagegen schlug die schnell erschienene ebenfalls zuerst gelbgrüne Färbung fast momentan in blaugrün um; die grüne Nüance verschwand rasch, und die Blaureaktion blieb bestehen, wie das bei gewöhnlicher roher Milch sich zeigt. Die Reaktion trat selbst bei einem Zusatz von 50 % erwähnter Rhodanammoniumlösung sehr prompt, wenn auch nicht so intensiv ein. Nach Utz ist also die Möglichkeit vorhanden, dass bei der Storch'schen Probe der mit der Ausführung umfangreicher Kontrolle betraute Beamte die Gelbgrünfärbung übersehen kann resp. durch die Beachtung der folgenden weissen Farbe sich täuschen lässt und die rohe Milch für genügend erhitzt befindet. Auf Grund seiner Beobachtungen erklärt deshalb Utz, dass

1. die Ursolprobe bis dahin (er prüfte noch das Jodkaliumstärkeverfahren) die einzige Methode sei, welche auch die mit Rhodansalz versetzte Rohmilch sicher nachweise, und
2. im Ursol D noch eine Substanz sein müsse, welche trotz der Anwesenheit von Rhodansalzen den Eintritt der Reaktion begünstige, und dass dieses der wesentlichste Unterschied zwischen Paraphenylendiamin und Ursol D sei.

Wirthle[2]) vertritt die Ansicht, dass das Ursol D nichts weiter als Paraphenylendiamin sei, wie es auch im Buch von Schultze-Julius stände. Zur Stütze seiner Behauptung dienen ihm seine mit 1 Paraphenylendiamin- und 2 aus verschiedenen Quellen bezogenen Ursolproben angestellten Versuche. Aus diesen ergab sich, dass

1. alle 3 Präparate bei 138 bis 139° (unkorrigiert) schmolzen, somit als identisch und als reines Paraphenylendiamin anzusehen waren;
2. alle 3 Substanzen nach Storch'scher Vorschrift — also Paraphenylendiamin sowie Ursol D in 2%iger wässeriger Lösung nebst 0,2%igem Wasserstoffsuperoxyd — angewandt, in der Reaktion vollständig übereinstimmten;
3. die Ursolproben wie das Paraphenylendiamin auch in Utz'scher Lösung (0,1 g in 30 ccm absolutem Alkohol) und mit Utz'schem Wasserstoffsuperoxyd (3 ccm $H_2 O_2$ v. 30 %. mit 97 ccm dest. Wasser) dieselbe Blaufärbung gaben, deren schwächerer Ausfall (als unter 2.) von Wirthle nur darauf zurückgeführt wird, dass in der Utz'schen Lösung etwas weniger Ursol bezw. Paraphenylendiamin zur Anwendung gelangt;

[1]) Raudnitz. „Sammelreferat über die Arbeiten aus der Milchchemie i. J. 1902". Monatsschrift Kinderheilk. 1903, Bd. 1. No. 5 cit. n. Utz. Chem.-Ztg. Cöthen 1903 und Berichtigung von Raudnitz ebenda.
[2]) Wirthle. Chem.-Ztg. Cöthen 1903, 432; cf. desgl. S. 300.

4. mit Rhodanammoniumlösung (1 %) versetzte Rohmilch (0,3 ccm auf 5 ccm Milch) auf Zusatz von Ursol resp. Paraphenylendiamin nach Storch in keinem Falle die Reaktion gab, während beim Arbeiten nach Utz — durch das hierbei in einer mindestens zehnfachen Menge zugesetzte Wasserstoffsuperoxyd — mit dem Paraphenylendiamin in gleicher Weise wie mit den Ursolproben die Blaureaktion ausgeführt wurde.

Nach Wirthle gibt es somit ein verschiedenes Verhalten des Ursols und Paraphenylendiamins auch bei Gegenwart von Rhodansalzen nicht, da nach seiner Auffassung die von Utz gemachten Unterschiede nicht auf Nebenbestandteile (Verunreinigungen) des Ursols, sondern vielmehr darauf zurückzuführen sind, dass das Wasserstoffsuperoxyd resp. der aus ihm freigemachte Sauerstoff durch Rhodansalze gebunden, bezw. infolge Mangels an Wasserstoffsuperoxyd die Reaktion verzögert wird. Es liefert ihm für letztere Annahme den Beweis die Beobachtung, dass auch bei Anwendung des Ursols und des Paraphenylendiamins nach Storch die mit Rhodanammonium versetzte Rohmilch eine starke Blaufärbung gab, wenn tropfenweise weitere Zusätze von 0,2%igem Wasserstoffsuperoxyd erfolgten.

Wirthle schliesst aus seinen Befunden:

1. das Ursol D ist identisch mit dem Paraphenylendiamin;
2. zum Nachweise ungekochter Milch ist das Storch'sche Reagens vorzüglich geeignet; tritt die Reaktion nicht direkt, sondern erst auf weiteren Zusatz von 0,2%igem Wasserstoffsuperoxyd ein, so liegt der Verdacht nahe, dass der Milch reduzierende Substanzen zugeführt wurden, und es erscheint geboten, jene darauf zu prüfen.

Gegen diese Vorhaltungen von Wirthle wendet sich Utz.[1]) Nach der ihm auf Anfrage von der Fabrik in Berlin zugegangenen Mitteilung werde unter der Bezeichnung „Ursol D“ das zu technischen Zwecken (Färberei) hergestellte Paraphenylendiamin in den Handel gebracht; das Storch'sche Reagens sei das reine Präparat. Weiterhin untersuchte Utz neben Paraphenylendiamin drei zu verschiedenen Zeiten bezogene, von ihm als Ursol D I, II und III bezeichnete Ursolproben.

Es ergab sich:

a) Ursol D I und II schmolzen (unkorrigiert) bei 133 bis 134°. Ursol D III und Paraphenylendiamin dagegen bei 138 bis 139°. Der Schmelzpunkt für das Paraphenylendiamin werde übrigens in der Literatur verschieden angegeben, so nach Merck's Index bei 140°, nach Schmidt Pharm. Chemie 1896 bei 147°, und liege jedenfalls bei 140°.

b) Alkoholische Lösungen von Ursol D I und II verhielten sich, unter einander übereinstimmend, spektralanalytisch ganz anders als diejenigen von Ursol D III und Paraphenylendiamin, die sich ihrerseits wieder als gleich erwiesen. Auch liess die Farbe der gleich starken Lösungen Unterschiede erkennen.

---

[1]) Utz. Milchztg. 1903, Nr. 27.

c) Wurden die vier Reagentien in Storch'scher Lösung nebst Storch'schem Wasserstoffsuperoxyd angewandt, so zeigten sich die von Wirthle beobachteten übereinstimmenden Befunde. Vor dem Zusatz einer zu starken Menge der benötigten Reagentien sei aber zu warnen, da, wie ein einfacher Versuch lehre, die Reagentien allein, somit auch mit gekochter Milch eine Blaufärbung geben könnten, die Täuschungen hervorzurufen imstande sei.

d) In 2%igen Lösungen und nebst 0,2%igem Wasserstoffsuperoxyd (also nach Storch'scher Vorschrift) zu der mit Rhodanammonium versetzten Milch gegeben, versagten Ursol D III und Paraphenylendiamin, wohl aber gaben Ursol D I und II die Reaktion.

Der Umstand, dass nach Zusatz weiterer Tropfen Wasserstoffsuperoxyd (nach Wirthle wird der aus letzterem abgespaltene Sauerstoff durch Rhodanammonium gebunden) auch beim Paraphenylendiamin die Blaufärbung erfolgt, ist nach Utz darauf begründet, dass bei starken Wasserstoffsuperoxydgaben auch zwischen dem Paraphenylendiamin und Wasserstoffsuperoxyd bezw. dessen Sauerstoff eine Reaktion zustande kommt, die mit der Abwesenheit von Milch nichts zu tun hat und demgemäss sowohl bei gekochter wie ungekochter Milch eintreten kann. Jede Willkür (besonders der Polizeibeamten) in dem Zusatze der Lösungen und etwaige hierdurch entstehende Täuschungen liessen sich durch den Gebrauch der, zudem haltbareren, Tabletten, in welchen die einzelnen Stoffe in genau ausgeprobten Quantitäten enthalten seien, vollkommen vermeiden. Utz schliesst:

1. Die Ursolprobe ist mit dem Storch'schen Verfahren nicht identisch.
2. Paraphenylendiamin und Ursol D III sind identisch, mit diesen beiden dagegen nicht Ursol D I und II.
3. Die Reaktion mit Ursol D I und II tritt auch bei Gegenwart von Rhodansalzen ein, was bei Paraphenylendiamin und Ursol D III nicht der Fall ist.

Utz erklärt ferner, dass seine Ursolprobe bereits von Professor Wender[1]) nachgeprüft und bezüglich der Richtigkeit vollauf bestätigt worden sei. —

In der Folge ist noch von Lauterwald[2]) in „Mitteilung XIII aus den Arbeiten der Versuchsstation für Molkereiwesen in Kiel" über Vergleichsversuche zwischen der Storch'schen und der Utz'schen Reaktion berichtet worden. Es wurden in Kiel zunächst Vorversuche angestellt, hierbei für die Ursolprobe eine Lösung von 0,1 g Ursol D in 30 ccm Alkohol (96 %) nebst einem Wasserstoffsuperoxyd von 3 Gewichts- oder 10 Volumenprozenten benutzt, und davon zu 5 ccm Milch 3 bis 4 Tropfen Ursollösung und 1 bis 2 Tropfen Wasserstoffsuperoxyd zugesetzt. Dabei zeigte sich, dass die Ursolreaktion gegenüber der Storch'schen Probe langsamer eintrat, und dass auch die Zeitdauer, welche bis zur Erreichung des Höhepunktes der Färbung verstrich, bei dem Ursolverfahren eine längere war. Letztere Erscheinung besserte sich auch auf weiteren Zusatz (2 bis 3 Tropfen) Wasserstoff-

[1]) Wender. Oesterr. Chem.-Ztg. 1903, 6, 3.
[2]) Lauterwald. Ref. Milchztg. 1903, 241.

superoxyd resp. bei Gabe von 8 Tropfen Ursollösung nicht, sondern spielte sich nur innerhalb geringerer Zeiträume ab, ganz gleich, ob die Milch roh oder auf 60, 65, 70 und 75° erhitzt war. Auch war die Intensität der Storch'schen Reaktion stets um eine Nüance stärker blau. Bei Milch, die auf 80° pasteurisiert war, zeigte sich mit beiden Verfahren keine Färbung mehr. Bei einer Mischung von ⅓ roher und ⅔ erhitzter Milch gingen die Zeiten, die zum Eintritt der Reaktion erforderlich waren, noch mehr zu Ungunsten der Ursolreaktion auseinander, während bei 2 % Rohmilchzusatz beide Reaktionen ziemlich gleichmässig und langsam eintraten, sodass die Empfindlichkeit der Verfahren nach dieser Richtung ziemlich gleich erschien.

Zu den Hauptversuchen wurden die Storch'schen und die Utz'schen Reagentien vorschriftsmässig hergestellt. Die Prüfung wurde mit

a) 2 ccm Milch, 0,5 ccm Utz'scher Wasserstoffsuperoxydmischung und 3 bis 4 Tropfen Ursollösung;
b) 10 ccm Milch, 2,5 ccm Utz'schem Wasserstoffsuperoxyd und ca 12 Tropfen Ursollösung;
c) 10 ccm Milch, 1 Tropfen Storch'schem Wasserstoffsuperoxyd und 2 Tropfen Paraphenylendiaminlösung

derart ausgeführt, dass zwei Personen zu gleicher Zeit die Zusätze und das Schütteln besorgten. Hierbei liess sich beobachten, dass gleich nach dem Schütteln die Ursolreaktion einige Augenblicke früher eintrat, dann aber bald in der Intensität der Färbung von der Storch'schen überholt wurde, welche auch schneller auf die Maximalfärbung kam. Die einige Augenblicke später den Höhepunkt der Färbung erreichende Ursolprobe erwies sich aber in der Blaufärbung etwas intensiver als die Reaktion Storch. Da indes genannte Erscheinungen sich innerhalb weniger Sekunden abspielten, erklärt Lauterwald die eine Reaktion für ebenso brauchbar wie die andere, vorausgesetzt, dass man bei beiden genau die Vorschriften befolge.

Der grössere Aufwand an Ursoltropfen ist nach Lauterwald darauf begründet, dass einer 2%igen Paraphenylendiamin- eine nur 0,33%ige Ursollösung gegenübersteht, während andererseits bei der Ursolprobe — wenn man 1 ccm als aus 20 Tropfen bestehend annimmt — auch ca 16 mal soviel wirksames Wasserstoffsuperoxyd angewandt wird.

Die Utz'schen Erfahrungen über die mit Rhodanammonium versetzte Milch erfuhren in Kiel ihre Bestätigung, indem beim Zusatz von 10 % bezw. 50 % einer Lösung von 4 g Rhodanammonium in 500 ccm Wasser zur unerhitzten Milch bei beiden Methoden zunächst eine Gelbgrünfärbung entstand. Während letztere aber bei der Storch'schen Probe nach kurzer Zeit in weiss umschlug, ging sie bei dem Ursolverfahren langsam durch schmutziggrau, rötlichgrau und rötlichblaugrau in blau über, an der Oberfläche einen rötlichen — nicht von Säuerung der Milch herrührenden — Schaum hinterlassend. Der Uebergang von gelbgrün zu blau spielte sich aber nicht, wie nach Meinung von Lauterwald das Utz beobachtet hat, in rascher Aufeinanderfolge, sondern im Verlaufe von 15 bis 20 Minuten ab, um erst noch später das Maximum der Blaufärbung zu erreichen. Auf 85° C. erhitzte und mit Rhodanammoniumlösung versetzte Milch gab mittelst beiden Reaktionen keine Veränderungen, wie auch die von

beiden Methoden in normaler Rohmilch hervorgerufenen Blaufärbungen durch nachträglichen noch so grossen Zusatz von Rhodanammonium nicht mehr zum Verschwinden gebracht werden konnten. Nach Lauterwald sind mindestens 0,08 g des Salzes pro 1 Ltr. Milch erforderlich, um die Storch'sche Reaktion zu verhindern, welche Beobachtung sich somit mit der Raudnitz'schen Angabe (1 g auf 10 l Milch) ungefähr deckt.

Die von Utz erwähnte leichte Zersetzlichkeit der Ursollösung wird in Kiel beglaubigt, denn letztere zeigte schon nach wenigen Tagen starke Bräunung, wogegen die Paraphenylendiaminlösung bei geeigneter Aufbewahrung wochenlang reaktionsfähig blieb.

Auf Grund dieser Erfahrungen gibt Lauterwald einen Unterschied zwischen den qlf. Reaktionen zu, weist aber darauf hin, dass das Ursol D scheinbar nicht immer mit derselben Gleichmässigkeit hergestellt werde, während gerade die verunreinigenden Nebenbestandteile des Ursols für die vom Paraphenylendiamin unterschiedliche Reaktion massgebend sein dürften.

Versuchsansteller erwähnt dann noch die von Utz empfohlenen Tabletten. Bezüglich des Hinweises auf die geringe Haltbarkeit des Ammoniumpersulfates in feuchtem Zustande bemerkt er: „Es ist das wohl so zu verstehen, dass — wenigstens wenn man bei der Reaktion sehr wenig Substanz und verhältnismässig viel Wasser bezw. Milch verwendet — zunächst Wasserstoffsuperoxyd entsteht. Zieht die Substanz beim Liegen an der Luft Wasser an, so lässt sich leicht denken, dass dieses konzentrierte Wasserstoffsuperoxyd sich sehr schnell in seine Bestandteile Wasser und Sauerstoff zersetzt. Für die Reaktion kann das Präparat natürlich nur dann brauchbar sein, wenn es zunächst unzersetztes Wasserstoffsuperoxyd liefert. Denn gäbe es — wie man die Utz'sche Angabe vielleicht missverstehen könnte — von vornherein ozonisierten Sauerstoff ab, so würde sowohl bei roher als auch bei gekochter Milch die Reaktion eintreten, mithin eine Unterscheidung nicht mehr möglich sein."

4. Die Richmond'sche Reaktion mit Metaphenylendiamin.

Von Richmond[1]) wird anstelle des Paraphenylendiamins das Metaphenylendiamin empfohlen, weil dieses, wenn auch eine hellere weniger intensive, so doch viel beständigere Färbung liefert. Mit Amylalkohol ausgeschüttelt, wird die Färbung beider Reaktionen von diesem aufgenommen. Die der Meta-Verbindung ist beständig, die des Paraphenylendiamins geht in braun über.

Siegfeld[2]) prüfte die Methode in 2%iger Lösung nebst 1%igem Wasserstoffsuperoxyd nach und fand die Färbung bei weitem weniger intensiv und infolgedessen die Reaktion weniger empfindlich als die des Storch'schen Reagenzes. Das Ausschütteln mit Amylalkohol hält er für eine unnötige Komplikation (cfr. Tabelle B. S. 43.)

---

[1]) Richmond. The Analyst 1900, 231 cit n. Siegfeld Milchztg. 1901 Nr. 46.
[2]) Siegfeld. Ebenda.

Nach Utz[1]) gibt eine Metaphenylendiaminchlorhydratlösung von 2 % eine der Paraphenylendiaminreaktion ähnliche, jedoch etwas schwächere Färbung von mehr schmutzig hellblauer Nüance.

5. Die Arnold-Mentzel'schen Reaktionen mit Paradiaethylparaphenylendiamin und Paradiamidophenylaminhydrochloricum.[2])

Arnold und Mentzel empfehlen zum Nachweis stattgehabter Milcherhitzung das Paradiaethylparaphenylendiamin und das Paradiamidophenylaminhydrochloricum, beide bei Th. Schuchardt-Görlitz erhältlich. Zur Ausführung der Probe sind erforderlich:

1. eine 2 bis 3%ige Lösung von Paradiaethylparaphenylendiamin in Alkohol oder Aceton;
2. eine schwach salzsaure gesättigte Lösung von Paradiamidophenylaminhydrochloricum (die Substanz wird dazu in schwach mit Salzsäure gesättigtem Alkohol gelöst, damit nicht eine bläuliche, sondern eine rötliche alkoholische Lösung derselben entsteht);
3. für beide Verfahren eine 4 bis 5%ige Wasserstoffsuperoxydlösung (käuflich).

Beide Lösungen geben mit Wasserstoffsuperoxyd allein keine Reaktion. Die Probe erfolgt so, dass zu je 10 ccm Milch 1 Tropfen der Wasserstoffsuperoxydlösung zugesetzt und dieses Gemisch mit 6 bis 8 Tropfen eines der beiden Reagentien geschüttelt wird. Es entsteht dann in unerhitzter Milch mit Paradiaethylparaphenylendiamin eine prachtvolle Rotfärbung, die allmählich in violett übergeht, mit Paradiamidophenylaminhydrochloricum eine blaugrüne Reaktion. Gekochte bezw. einige Minuten auf 80° pasteurisierte Milch gibt (als Folge der zerstörten, Wasserstoffsuperoxyd zersetzenden Oxydase) nach dem Schütteln keine Reaktion mehr. Die auch hier nach längerer Zeit langsam sich vollziehenden schwachen Verfärbungen liefern den Verfassern nur den Beweis dafür, dass auch in genügend erhitzter Milch eine allmähliche Wasserstoffsuperoxydzersetzung vor sich geht, welche nicht von der Oxydase verursacht wird. Ausserdem sind noch 2 % roher in gekochter Milch mit beiden Verfahren nachweisbar, und zwar beim ersteren nach etwa 3, beim zweiten in 1 bis 2 Minuten (hier Grünlichfärbung). Auch mit Serum lassen sich die Reaktionen erhalten, ganz gleich ob dieses durch freiwillige Gerinnung der Milch oder durch Zusätze zu dieser hergestellt wird. — Führt man mit der mit Wasserstoffsuperoxyd gemischten Milch unter Zusatz von 7—8 Tropfen Paradiamidophenylaminhydrochloricum eine Zonenreaktion aus, so lassen sich selbst Spuren von Oxydase nachweisen, z. B. ½ bis 1 % rohe in gekochter Milch, durch eine sich sofort bemerkbar machende bläulichgrüne Färbung.

Als Mangel der Lösungen dieser beiden Reagentien erwähnen Arnold und Mentzel ihre geringe Haltbarkeit. (Angaben über Nach-

---

[1]) Utz. Pharm. Centralh. 1901, 149.
[2]) Arnold u. Mentzel. Zeitschr. f. Unters. d. Nahr. u. Genussm. 1903, 548 cit. n. Molk. Ztg. Berlin 1903, 292 u. Rep. Chem.-Ztg. Cöthen 1903, 191.

prüfungen dieser Verfahren finden sich in der mir zu Gebote stehenden Literatur nicht. Anm. d. Verf.) —

Anhangsweise sei hier erwähnt, dass auch mit Tetramethylparaphenylendiaminlösung und verdünntem Wasserstoffsuperoxyd für Rohmilch eine prächtige Violettfärbung charakteristisch ist (Neumann-Wender[1]), K. Aso[2])). Dieses Reagens wurde deshalb von Grüss[3]) in Form des Chlorhydrates zum Nachweis der Oxydase empfohlen.

6. Die Dupouy'schen Methoden.

Dupouy[4]) hat ausser der von ihm modifizierten Guajakprobe[5]) zur Untersuchung auf Milcherhitzung noch folgende Substanzen (Tabelle A) empfohlen, deren interessante Farbenerscheinungen er der schon öfter citierten Oxydase zuschreibt.

Tabelle A.: Die Dupouy'schen Reagentien.

Reagens	Bei der Probe gemischt	Reaktionen a) Rohmilch	Reaktionen b) gek. Milch
1. Guajakol (krystall.)	1 ccm Milch + 1 ccm wässerige 1 %-ige Lösung + 1 Tropfen Wasserstoffsuperoxyd (10 %)	orangegelb	0
2. Hydrochinon	3 ccm Milch + 1 ccm frisch bereitete wässerige 10 %-ige Lösung + 15 Tropfen Wasserstoffsuperoxyd (10 %)	rosa, dann Ausscheidung grüner Krystalle v. Chinhydron	0
3. Brenzkatechin	1 ccm Milch + 1 ccm wässerige 10 %-ige Lösung + 1 Tropfen Wasserstoffsuperoxyd (10 %)	gelbbraun	0
4. α-Naphtol	Eine Wenigkeit in etwas Wasser gelöst + gleiches Volumen Milch + 1 Tropfen Wasserstoffsuperoxyd (10 %)	blauviolett	0
5. Paraphenylendiamin	Einige Centigramm in Wasser gelöst + gleiches Volumen Milch + 1 Tropfen Wasserstoffsuperoxyd (10 %)	dunkelviolett	0

Dupouy bevorzugte von diesen Substanzen zunächst das Para-

[1]) Neumann-Wender. Molk. Ztg. Berlin 1904, 63.

[2]) K. Aso. The Bulletin of the College of Agricultur, Tokyo Imperial University Vol. 5, Nr. 2, S. 230 ff., cit. n. Centralblatt f. Agrikulturchem. 1903, 428.

[3]) Grüss. Wochenschr. f. Brauerei 1899, 523.

[4]) Dupouy. Rép. de Pharm. 1897, 206 cit. n. Pharm. Centralh. 1897, 392 u. Molk.-Ztg. Berlin 1897, 283; ferner Bulletin des travaux de la société de pharm. de Bordeaux. Oct. 1902 u. desgl. Schweiz. Wochenschr. f. Chem. und Pharm. 1903, cit. n. Utz Milchztg. 1903, 129 u. 594.

[5]) cf. S. 14.

phenylendiamin. Weil dieses aber — namentlich in Lösung — schon durch den Sauerstoff der Luft verändert bezw.gefärbt wird, empfiehlt er später an dessen Stelle krystallisiertes Guajakol, dessen Lösung ausserordentlich haltbar sei. Nach seinen erneuerten Versuchen gibt eine 1%ige wässerige Guajakollösung nebst einem Tropfen der gewöhnlichen, aber zuvor auf $^1/_{10}$ verdünnten Wasserstoffsuperoxydlösung mit unerhitzter Milch sofort und in der Kälte eine granatrote Reaktion, während gekochte oder über 80° pasteurisierte Milch farblos bleibt.

Leffmann[1]) hat zuerst die Dupouy'schen Reaktionen nach dessen Vorschrift wiederholt geprüft und hält das Paraphenylendiamin für das empfindlichste Reagens, betont jedoch, dass dasselbe nur in frischer Lösung angewandt werden dürfe, da sonst diese schon nach mehrstündigem Stehen auch ohne Wasserstoffsuperoxyd der gekochten Milch die blaue Färbung gebe. Die Reaktion tritt auch bei unerhitzter saurer Milch ein. Bei über 82° pasteurisierter bleibt sie hingegen aus. Als Ursache der Reaktion sieht Leffmann die Enzyme in der Milch an, die bei 80° ihre Wirkung verlieren.

Weiterhin hat Siegfeld[2]) die von Dupouy vorgeschlagenen Stoffe sowie ferner noch das Pyrogallol versucht. Zu jeder Probe wurden 10 ccm Milch mit 2 Tropfen Wasserstoffsuperoxyd (medizinisch) und der Reagenslösung geschüttelt. Die Stärke der Lösungen, die davon zugesetzten Mengen und die erzielten Resultate sind aus der seinem Referate entnommenen Tabelle B, S. 43 ersichtlich. (Letzterer sind ferner die Ergebnisse mit der Guajaktinktur wie auch der Para- und Metaphenylendiaminreaktion angegliedert worden, worauf S. 15, 28 u. 39 hingewiesen wurde.)

Nach einem späteren Bericht hat sich Siegfeld speziell noch mit dem Guajakol beschäftigt, weil dieses Reagens wiederholt in der Literatur angepriesen worden war. Da jedoch zu seinem ersten Versuch von einer 2%igen Lösung 10 ccm auf eine gleiche Menge Milch angewandt werden mussten, und ferner das Verfahren Zusätze von 10 % roher zur genügend erhitzten Milch nicht zu erweisen vermochte, so gebrauchte er nunmehr eine 20%ige alkoholische Lösung. Hiervon wurden 10 Tropfen nebst 2 Tropfen Wasserstoffsuperoxyd zu 10 ccm Milch zugesetzt. Es erfolgte nach etwa ½ Minute eine fleischfarbene, allmählich in orange übergehende Färbung, die bei Gemischen von stark erhitzter und 10 % roher Milch auch noch rasch zur vollen Stärke anstieg, bei Mischmilch mit 5 % Rohmilchgehalt dagegen fortblieb bezw. sich erst bei Anwendung von 1 ccm des Reagenzes nach 1 Minute hell fleischfarben äusserte. Siegfeld erklärt das Guajakolverfahren als brauchbar, aber an Schnelligkeit des Eintrittes und an Intensität seiner Reaktion dem Paraphenylendiamin nachstehend.

---

[1]) Leffmann. Schweiz. Wochenschr. f. Chem. u. Pharm. 1898, 201 cit. n. Pharm. Centralhalle.

[2]) Siegfeld. Milchztg. 1901, 723; ferner Zeitschr. f. angew. Chemie 1903, Heft 32, 771 cit. n. Utz, Milchztg. 1903, 594.

Tabelle B.: Die Versuche von Siegfeld.

Reagens	Stärke der Lösung	Angewandte Menge	Reaktionen				
			Frische Milch	Erhitzte Milch	9 Teile erhitzte + 1 Teil frische Milch	10 ccm „frische“ Milch + 1 Tropfen Formalin	10 ccm „erhitzte“ Milch + 1 Tropfen Kaliumbichromat
1. Pyrogallol	2 %	2 Tropf.	dunkelorange	0	deutliche Reaktion	etwas abgeschwächt	schmutzig braun
2. Hydrochinon	„	20 Tropf.	hell fleischfarben	0	sehr schwache Reaktion	abgeschwächt	schwache Verfärbung, dunkelt zu braunviolett nach
3. Guajakol	„	10 ccm	hell fleischfarben, blasst stark ab	0	0	unveränderte Reaktion	0
4. Brenzkatechin	10 %	„	hell fleischfarben, blasst stark ab	0	langsam auftretende, sehr schwache Reaktion	etwas abgeschwächt	intensiv violett
5 α-Naphtol	aufgeschlämmt	0,5 g	schwach blauviolett, blasst rasch ab	0	sehr langsam auftretende, aber fast voll stark werdende Reaktion	unveränderte Reaktion	0
6. p.-Phenylendiamin	2 %	2 Tropf.	tief indigoblau	0	intensive Reaktion	etwas heller mit violetter Nüance, blasst rascher ab	wie Rohmilch, dunkelt stark nach
7. m-Phenylendiamin	„	„	hellblau	0	schwache Reaktion, erst nach einiger Zeit	grünlichweiss	grünlichblau
8. Guajakholztinktur	—	1 ccm	in 2 bis 3 Minuten himmelblau, blasst rasch ab	0	langsam bis fast zur vollen Stärke kommende Färbung	unveränderte Reaktion	wie Rohmilch

Raudnitz[1]) hält das Guajakol für das beste Reagens zum Nachweis der Milcherhitzung.

Utz[2]) versuchte das krystallisierte Guajakol in 5%iger alkoholischer Lösung nebst 0,1 %igem Wasserstoffsuperoxyd und erzielte hiermit zufriedenstellende Resultate. Nach ihm besitzt das Guajakolverfahren vor anderen Methoden folgende Vorteile:

1. Gegenüber der Guajaktinktur ist die Guajakollösung nach Herstellung sofort brauchbar und, in brauner Flasche aufbewahrt, in weit grösserem Masse haltbar als die Paraphenylendiamin- bezw. Ursollösung.

2. Die Guajakollösung gibt weder mit verdünntem, noch mit reinem Wasserstoffsuperoxyd irgend eine Reaktion. Somit ist, wenn sich alle Handelssorten von Guajakol gleich verhalten, ein Anlass zu Täuschungen in gekochter Milch ausgeschlossen. Für letzteres spricht auch das frühere Verblassen der orangeroten Färbung.

3. Der Säuregrad beeinflusst die Guajakolreaktion nicht. Sie tritt selbst bei geronnerer ungekochter Milch, ebenso bei Serum ein.

Mit der 5%igen Guajakollösung konnte Utz noch 5 % roher in gekochter Milch deutlich nachweisen, wenngleich die Reaktion bereits langsam und schwach kam. Die bekannten Konservierungsmittel übten, in den gebräuchlichen Mengen angewandt, keinen nachteiligen Einfluss auf den Eintritt der Reaktion aus; gleichfalls nicht grössere Mengen von Formaldehyd, die bereits durch den Geruch wahrgenommen werden.

Spolverini[3]) benutzte eine wässerige Lösung von krystallisiertem Guajakol (1 : 100) zum Nachweis des oxydierenden Fermentes in der Milch. Er erhielt durch Vermischen gleicher Volumina Milch und Guajakol nebst einigen Tropfen des im Handel käuflichen Wasserstoffsuperoxydes in 4 bis 5 Minuten eine schöne Rotfärbung. Diese trat früher und kräftiger ein, wenn die Milch im Thermostaten auf 35° gebracht wurde.

Kollo[4]) in Bukarest mischte gleiche Mengen von Milch und 1%iger wässeriger Guajakollösung (Guajakol kryst.) nebst 1 Tropfen Wasserstoffsuperoxyd. Nach seinen Angaben kennzeichnet unerhitzte Vollmilch, Magermilch, Rahm und Molke gleichmässig eine dunkel-rosarote Reaktion. Diese tritt auch ein bei Milch, welche kurze Zeit auf 60° und 70° pasteurisiert ist. Bei längerem Erhitzen, besonders auf höhere Temperaturen, bleibt die Milch farblos. Auch Gemische von roher und gekochter Milch erzeugen die rote Guajakolreaktion, desgleichen Rohmilch mit Formalinzusatz (1 %). Die zu den Untersuchungen zu benutzende Guajakollösung muss jedoch unbedingt farblos sein. Kollo hält die Guajakollösung für ebenso scharf wie die Paraphenylendiaminlösung, zieht sie aber wegen ihrer grossen Haltbarkeit

---

[1]) Raudnitz. Monatsschrift f. Kinderheilk. 1903, Bd. I, Nr. 5 cit. n. Utz. Milchztg. 1903, 594.

[2]) Utz. Ebenda.

[3]) Spolverini. Revue infantile. cit. n. Milchztg. 1904, Nr. 26.

[4]) Kollo. Pharm. Post 1903, 36, 741. Zeitschr. f. Unters. d. Nahr. u. Genussm. 1905, 556. cit. n. Pharm. Centralhalle 1904, 271 und Milchw. Centralblatt 1906, Nr. 4.

der letzteren vor. Ferner macht er den Vorschlag, das Verfahren durch Anwendung von Guajacolum liquidum absolutum des Handels zu vereinfachen, von dem 2 Tropfen im Reagensglas mit etwa 10 ccm Wasser zu vermischen sind.

Weber[1]) empfiehlt an Stelle des Guajakols das Kreosot, welches u. a. Guajakol enthält, und zwar aus folgenden Gründen:

1. die wässerige 1%ige Guajakollösung werde in brauner Flasche verabfolgt, mit dem Bemerken, dass sich das Guajakol nicht vollkommen löse und deshalb die Flüssigkeit vor dem Gebrauch umzuschütteln sei, was beweise, dass die Lösung nicht konstant und nicht lange haltbar sein könne;

2. die zur Ausführung der Reaktion (sc. n. Dupouy. Anm. d. Verf.) erforderliche Menge der Guajakollösung sei verhältnissmässig bedeutend.

Die Kreosotprobe erfolgt derart, dass etwa 2 ccm Milch mit 1 Tropfen medizinischem Wasserstoffsuperoxyd und 5 Tropfen des in der Therapie verwendeten Kreosotes gut durchgeschüttelt werden. Rohmilch wird hiernach innerhalb ½ bis 1 Minute matt rotbraun, in 2 Minuten hell rotorange und erreicht nach 10 bis 20 Minuten in rotorange die höchste Intensität der Reaktion. Letztere erfolgt auch in erwärmter Milch, fällt aber von 70° ab schwächer aus und bleibt bei Milch, die auf 79 bis 80° und darüber erhitzt worden ist, gänzlich fort, wobei es gleichgültig ist, ob die Milch in heissem oder in kaltem Zustande geprüft wird. Weiterhin sind Zusätze von 10 % roher zur gekochten Milch (geringere Beimengungen wurden von Weber nicht geprüft) noch deutlich nach 4 bis 10 Minuten in matt rotbrauner Färbung zu erkennen. Bei stärkeren Rohmilchzusätzen kommt die Reaktion schneller und intensiver; von 50 % ab wird sie hell rotorange. Die Kreosotprobe ist auch für saure Milch brauchbar, desgleichen auch für Molke und Serum, welche nach dem Umschütteln eine unwichtige milchige Trübung annehmen. Weber hat ferner konservierte Milch untersucht, und zwar unter Benutzung derselben Substanzen als bei der Guajakprobe und der Paraphenylendiaminprobe (cf. S. 17 und 30). Aus seinen Ergebnissen erhellt, dass das Kreosotverfahren im allgemeinen in denselben Fällen versagt wie die Guajakringprobe und das von Weber modifizierte Storch'sche Verfahren. Gegenüber letzterem ergibt sich aber als wichtige Besonderheit, dass Formalin als das beliebteste Konservierungsmittel für Laboratoriumszwecke die Kreosotprobe nicht beeinflusst.

7. **Das Jodkaliumstärkeverfahren.**

du Roi und Koehler[2]) empfehlen (in ihren Versuchen unabhängig von Storch) Jodkaliumstärkekleister und Wasserstoffsuperoxyd zum Nachweise unerhitzter Milch. 2 bis 3 g Jodkalium werden in etwas Wasser gelöst und mit einer Stärkelösung, welche durch Uebergiessen

[1]) Weber. Dissertation, Leipzig 1902.
[2]) du Roi-Koehler cit. n. Milchztg. 1902, S. 17. cf. desgl. in „Der Landbote" Prenzlau 1901, Nr. 103.

von 2 bis 3 g Stärke mit ca 100 ccm heissen Wassers hergestellt wird, gemischt. Bei der Probe gibt man zu 50 ccm Milch 2 %, d. h. 1 ccm 1 %iges Wasserstoffsuperoxyd, giesst etwa 3 ccm des Gemisches in ein Reagensglas und setzt die gleiche Menge Jodkaliumstärkekleister hinzu. Nach kräftigem Schütteln färbt sich rohe Milch blau, auf 80° und darüber erhitzte soll rein weiss bleiben. Beim Arbeiten mit geringeren Milchmengen sind entsprechend verdünnte Wasserstoffsuperoxydlösungen zu verwenden, z. B. auf 10 ccm Milch 1 ccm Wasserstoffsuperoxyd von 1/5 %. Mit der du Roi-Koehler'schen Jodkaliumstärkeprobe sind noch 2 % roher in erhitzter Milch nachweisbar. Formaldehyd bezw. Kaliumbichromat verhindern, in der üblichen Menge zugesetzt, die Reaktion nicht; denn es tritt die Färbung sogar bei einer Gabe von 10 Tropfen 10 %iger Kaliumbichromatlösung resp. 20 Tropfen Formaldehyd auf 50 ccm Milch mit genügender Schärfe ein, wenn auch in letzterem Falle erst nach 2 bis 3 Minuten. Genügend erhitzte Milch mit der genannten starken Menge Kaliumbichromat (Oxydationsmittel) vermischt, erzeugt nach längerem Stehen eine mit der eigentlichen Reaktion nicht zu verwechselnde Farbenänderung. Rohe saure Milch zeigt sofort intensive Blaufärbung (wie solches auch von Storch[1]) festgestellt worden ist. Anm. d. Verf.); diese stellt sich jedoch auch bei saurer erhitzter Milch — je nach dem Säuregrade — mehr oder weniger intensiv ein und unterscheidet sich dann in nichts von der Reaktion der Rohmilch. Wird die saure Milch aber durch Zusatz von Alkalien auf 7 Säuregrade (Soxhlet) gebracht, d. h. normal gemacht, so tritt die Unterscheidung genügend scharf hervor. Für Magermilch, Rahm und Molke gilt das von der VollmilchGesagte. Die Versuchsansteller erklären endlich ihr Verfahren für billiger als die von Storch vorgeschlagene Paraphenylendiaminreaktion.

Storch[2]) hat das Jodkalium schon vor du Roi und Koehler versucht. Nach seiner Auffassung ist die Methode bei gewisser Vorsicht wohl brauchbar, doch verwirft er sie wegen der leichten Zersetzlichkeit der Jodkaliumstärkelösung. Durch Zusatz von $^1/_{20}$-Normalhyposulfitlösung zum Jodkaliumstärkekleister (1 Tropfen auf 50 ccm) werde letzterer haltbarer gemacht bezw. freigewordenes Jod wieder gebunden.

Siegfeld[3]) schreibt: Die Jodkaliumstärkelösung hat den prinzipiellen Fehler, dass sie auch ohne Anwesenheit von Milch durch Wasserstoffsuperoxyd zersetzt wird. Trotzdem ist sie brauchbar, wenn man der Milch nicht mehr als 1 % ihres Volumens an 1%igem Wasserstoffsuperoxyd zusetzt. Vorzüge vor der Storch'schen Reaktion hat die du Roi-Koehler'sche nicht .

Utz[4]) prüfte ebenfalls das Verfahren nach und hebt die Wichtigkeit der Konzentration des Wasserstoffsuperoxydes hervor. Letzteres ist zu untersuchen, ob es nicht schon an sich mit Jodkaliumstärkekleister eine Blaufärbung gibt. Stärkere Konzentrationen als von 0,1 % sind zu vermeiden. Desgleichen ist nur auf Färbungen, welche

[1]) Storch. cit. n. Ref. Centralbl. f. Agrik. Chem. 1898, 712.
[2]) Storch. Milchztg 1902, 81.
[3]) Siegfeld. Molk.-Ztg. Hildesheim 1903, 792.
[4]) Utz. Milchztg. 1902, Nr. 10, desgl 1903, 291; cf. auch Chem. Ztg. Cöthen 1903, 300.

innerhalb 5 Minuten entstehen, Rücksicht zu nehmen, da bei längerem (stundenlangem) Stehen auch in gekochter Milch allmählich der Reaktion ähnliche Farbenerscheinungen auftreten. Zur Aufbewahrung und Herstellung des Jodkaliumstärkekleisters empfiehlt Utz den Apparat und die Angaben von Soltsien[1]: Ein geräumiger Erlenmeyerkolben wird mit einem Stopfen verschlossen, durch den ein nach unten gebogenes Glasrohr von etwa 10 mm Weite hindurchgeht. In dem Kolben wird der Jodkaliumstärkekleister bereitet, durch Kochen steril gemacht und das Rohr an der Ausflusstelle mit Watte verschlossen. Nach Entfernung der letzteren kann nun durch vorsichtiges Neigen und Wiederaufrichten des Kolbens die zur Reaktion benötigte Menge der Flüssigkeit ausgegossen werden, ohne dass Staub und mit ihm Keime in das Innere des Gefässes gelangen. Der Stärkekleister bleibt auf diese Weise sehr lange haltbar, nach den Befunden Soltsiens sogar bis zu 7 Monaten. — Bei späteren Versuchen machte Utz noch die Erfahrung, dass mit Rhodanammonium versetzte Rohmilch die Jodkaliumstärkereaktion versagt und demgemäss irrtümlich für erhitzte befunden werden kann.

Arnold und Mentzel[2]) bezeichnen die du Roi-Koehler'sche Reaktion als empfindlich. Sie bemängeln aber, dass infolge der Einwirkung des Wasserstoffsuperoxydes auf Jodkalium auch in gekochter Milch nach kurzer Zeit eine Blaufärbung durch Jodausscheidung zustande kommt.

8. Das Schardinger'sche Verfahren.[3])

Im Gegensatz zu den bisher angeführten, auf Oxydationsvorgängen beruhenden Farbenreaktionen verwendet Schardinger die Reduktionskraft ungenügend erhitzter Milch gegenüber alkoholischer Methylenblau- resp. Methylenblauformalinlösung. Es sind erforderlich:

1. eine Methylenblaulösung (M), hergestellt aus einem Gemisch von 5 ccm gesättigtem alkoholischem Methylenblau + 5 ccm Formalin + 195 ccm dest. Wasser;
2. eine Methylenblau-Formalinlösung (FM), bestehend aus 5 ccm gesättigtem alkoholischem Methylenblau + 5 ccm Formalin + 190 ccm dest. Wasser.

Eine Veränderung in der Zusammensetzung und der Wirksamkeit dieser Lösungen tritt nach Schardinger auch bei längerem Stehen nicht ein, denn sie erwiesen sich nach 8 Monaten gerade so brauchbar wie bei den ersten Versuchen.

Anstellung der Probe.

Je 20 ccm Milch werden in hohen, engen Reagensgläsern mit 1 ccm M resp. FM gefärbt und in ein Wasserbad von 45 bis 50° gestellt.

a. Von zwei Proben roher frischer Milch wird FM in kurzer Zeit (etwa 5 bis 10 Minuten) entfärbt, während M gefärbt bleibt.

---

[1]) Soltsien. Pharm. Ztg. 1897, 293.

[2]) Arnold und Mentzel. Zeitschr. f. Fleisch- u. Milchhygiene. cit. n. Milchztg. 1902, 247.

[3]) Schardinger. Mitteilungen a. d. k. k. allgem. Versuchsanst. f. Lebensmittel i. Wien. cit. n. Molk.-Ztg. Berlin 1902, 614; Milchztg. 1903, 129; Chem. Ztg. Cöthen 1904, 704. cf. auch Zeitschr. f. Unters. d. Nahrungs- und Genussm. 1902, 1113.

b. Von älterer, d. h. säuernder aber noch nicht geronnener Milch wird FM stets, M manchmal entfärbt, je nach der Höhe des Säuregrades. Je näher die Milch der Gerinnung (durch Kochen) steht, um so rascher wird gewöhnlich eine mit M gebläute Probe reduziert.

c. Proben von gekochter Milch entfärben weder F M noch M.

Die Entfärbung, d. h. der Uebergang des Methylenblaues in das farblose Leukomethylen erfolgt allmählich, und zwar in einer schon nach kurzer Zeit bemerkbaren, von unten heraufsteigenden Abnahme der Blaufärbung. Der Uebergang der bläulich-weissen Farbe am Schlusse des Prozesses in weiss vollzieht sich dagegen meist plötzlich. Die oberste einige mm starke Flüssigkeitsschicht bleibt blau. Beim Mischen der entfärbten Proben mit Luft stellt sich die Blaufärbung schnell wieder her; die Reduktion im Wasserbade vollzieht sich nunmehr in viel kürzerer Zeit. Diese erneuerten Entfärbungen finden auch bei gewöhnlicher Zimmertemperatur statt, jedoch ist die Zeitdauer eine ungleich grössere. Fördernd für die Entfärbung erweist sich neutrale oder schwach alkalische Reaktion der Milch, hemmend — ausser Erhitzung — die Verdünnung mit Wasser. Wird eine freiwillig geronnene Milch mit etwas Kalkmilch alkalisch gemacht und mit M[1]) gefärbt, so tritt innerhalb kurzer Zeit Entfärbung ein; die Zeitdauer für diese ist von der Stärke der Alkalität abhängig. Bleibt eine derartig entfärbte Probe einige Zeit bei Zimmertemperatur stehen, so zeigt sich eine interessante Schichtentfärbung: auf die untere weisse folgt eine schmale blaue und auf diese eine rote Schicht, bestehend aus Fett, die sich in Aether mit roter Farbe löst. Durch Zusatz von Essigsäure oder durch freiwillige Gerinnung der Milch erhaltenes Serum äusserst in saurem Zustande keine reduzierende Wirkung, wohl aber wenn es alkalisch gemacht wird. Freie Säuren, organische wie anorganische, scheinen auf die reduzierenden Substanzen eine hemmende resp. zerstörende Wirkung auszuüben.

Bezüglich der Entfärbung von mit Methylenblau allein gemischter Milch, welche erst in einem Stadium intensiveren bakteriellen Lebens vor sich geht, gibt Schardinger zwei Möglichkeiten an:

1. durch die in der Milch angesiedelten Mikroben würden aus dem Milchzucker oder aus den Eiweisskörpern Stoffe mit reduzierenden Eigenschaften gebildet,[2]) welche den Zusatz von Formaldehyd in diesem Stadium unnötig machten. Dafür sprächen die Versuche Farnsteiners,[3]) der in säuernder Milch die Bildung aldehydartiger Körper nachgewiesen habe. Bei der Probe könnte anstelle des Formaldehyds auch Acetaldehyd angewendet werden.

2. Andererseits sei eine Entfärbung durch die Mikroben selbst resp. durch ihr „lebendes" Protoplasma denkbar. Schardinger neigt auf Grund der eigenen Versuche der letzteren Auffassung zu.[4])

---

[1]) Dasselbe fand später Utz auch bei FM bestätigt.

[2]) Schardinger hat ausserdem bemerkt: in alkalischer freiwillig gesäuerter Milch hatte man mit der Anwesenheit von Glycose zu rechnen, die durch bakterielle Tätigkeit aus der Lactose entstanden sein konnte und für sich schon eine reduzierende Wirkung auf das Methylenblau äussern würde.

[3]) Farnsteiner. Forschungsberichte über Lebensmittel 1896, 3, 363.

[4]) cf. auch Rep. 23 z. Chem.-Ztg. Coethen 1903.

R. W. Raudnitz[1]) bestreitet die Neuheit der Schardinger'schen Reaktion unter dem Hinweis, dass diese Vorgänge bereits 1897 von Vaudin[2]) am Indigo und 1900 von Neisser und Wechsberg[3]) am Methylenblau beobachtet worden seien. Hierzu erwidert Schardinger, dass genannte Befunde mit den seinigen nur entfernte Aehnlichkeit hätten.

Siegfeld[4]) bestätigt die Resultate Schardingers, hält aber das Verfahren für zu umständlich und die Farbenunterschiede für zu gering. Schardinger gibt eine gewisse Umständlichkeit zu, hebt dagegen die Sicherheit der Reaktion hervor und erklärt die Unterschiede für ein normales Auge als deutlich genug.

Utz[5]) machte die Beobachtung, dass die Reaktion im allgemeinen nur dann eintrat, wenn die Milch frisch war oder nur kurze Zeit gestanden hatte, während bei älterer Milch die Entfärbung auszubleiben pflegte resp. in solchen Fällen auch dann nicht erfolgte, wenn die Gemische mit den Farbstofflösungen 1 bis 2 Tage bei der angegebenen Temperatur stehen blieben. Aus verschiedenen Angaben Schardingers, insbesondere, dass sich neutrale oder schwach alkalische Reaktion der Milch fördernd für den Eintritt der Entfärbungserscheinungen erweist, folgerte Utz, dass die Milch alkalisch reagieren müsse, und versetzte alle jene Proben von ungekochter Milch mit verdünnter Kalkmilch. Er erhielt dann ausnahmslos die Reaktionen sowohl bei F M wie bei M. Er konstatierte solche jedoch ständig auch bei gekochter Milch, als er diese alkalisch machte. Alle anderen Beobachtungen Schardingers fanden bei den Utz'schen Versuchen ihre Bestätigung. Wie weiterhin Utz auseinandersetzt, hätte Schardinger, der den Schwefelwasserstoff als Ursache der Entfärbungen aufgefasst hat, an jene Eiweisskörper bezw. Gruppen von Eiweissstoffen gedacht, welche schon bei gewöhnlicher Temperatur dieses Gas leicht abspalteten. Letztere Ansicht sei aber experimentell noch nicht bewiesen worden, und der Nachweis von Schwefelwasserstoff in frischer ungekochter Milch bislang nicht geglückt. Die reduzierende Wirkung sei vielmehr auf den Milchzucker zurückzuführen, weil die Reaktion mit Methylenblau nicht nur bei unerhitzter, sondern auch bei gekochter und hierauf alkalisch gemachter Milch zustande komme, und in letzterer der Milchzucker unzersetzt enthalten sei. — In der Erwiderung hierzu bezeichnet Schardinger die aus seinem Referat von Utz gemachte Folgerung, dass die Milch zur Anstellung der Probe alkalisch reagieren müsse, als ein Missverständnis. Der Milchzucker sei nicht das entfärbende Agens; denn sonst müsste die Methylenblaulösung von ganz frischer Milch ebenfalls reduziert werden,[6]) weil diese ja auch Milchzucker enthalte.

Nach Rullmann[7]) lässt sich die Schardinger'sche Methylenblau-

[1]) Raudnitz. cit. nach Utz, cf. ferner Schardinger Chem. Ztg. Coethen 1904, 704.
[2]) Vaudin. Rép. de Pharm. 1897, (3) 9, 538 und
[3]) Neisser und Wechsberg. München. mediz. Wochenschr. 1901, Nr. 37; beide cit. n. Smidt, Referat Molk.-Ztg. Berlin 1905, 208 (Hygien. Rundsch. 1904).
[4]) Siegfeld. cit. n. Chem. Ztg. Coethen 1904, 704.
[5]) Utz. Milchztg. 1903, 129.
[6]) d. h. ohne dass die frische Milch alkalisch gemacht wird. Anm. d. Verf.
[7]) Rullmann. Zeitschr. f. Untersuchung der Nahrungs- u. Genussm. 1904, cit. n. Molkerei-Ztg. Berlin 1904, 137.

Formalinlösung mit gutem Erfolge verwenden, doch zieht er die Guajakprobe mit Wasserstoffsuperoxyd und die Reaktion mit Paraphenylendiaminchlorhydrat vor.

Weiterhin hat sich noch Smidt[1]) eingehend mit der Schardinger'schen Reaktion beschäftigt. Die Anwendung der letzteren ist nach seinen Versuchen ausgeschlossen, wenn alkalische Zusätze in der Milch vorhanden sind, da in derartigen Fällen schon Milchzucker allein die Reduktion des Methylenblaues hervorrufen kann. Die Entfärbung der Methylenblaulösung wird begünstigt durch einen geringen Formalinzusatz (Lösung II (FM) von Schardinger), dagegen unterdrückt durch stärkeres Erhitzen resp. Kochen der Milch, sowie durch schwache Zusätze von Blausäure oder durch höhere Gaben von Formalin zu der Milch. Hinsichtlich der Stärke des Pasteurisierens verhält sich die Methylenblau-Formalinlösung bei ein und derselben Milch folgendermassen:

Die Entfärbung trat noch ein, nachdem die Milch

	10 Minuten	auf 70°
	20 „	
	30 „	
sowie	10 „	auf 75°

pasteurisiert worden war; die Reduktion erfolgte dagegen nicht mehr in der

	20 Minuten	auf 75°
	30 „	
sowie	10 „	auf 78°
	20 „	
	30 „	

erhitzt gewesenen Milch. Nach Smidt ist die Schardinger'sche Reaktion nicht auf die Tätigkeit von Bakterien zurückzuführen.[2]) Dagegen spricht der relativ hohe antibakteriell wirkende Formaldehydgehalt und die Schnelligkeit der Entfärbung. Es dürfte sich vielmehr um die Wirkung eines Fermentes handeln, das als Katalysator die reduzierenden Eigenschaften des Formaldehyds vermittelt. Da auch andere Aldehyde, z. B. Acetaldehyd, in ähnlicher Weise die Reaktion unterstützen, wie Formaldehyd, so bezeichnet Smidt dieses Ferment als „Aldehydkatalase". Ferner gibt er an, dass der beim Centrifugieren frischer Milch erhaltene Rahm die Schardinger'sche Reaktion deutlicher erzeugt als Vollmilch, während Magermilch die Fähigkeit hierzu ganz verloren hat. Die Katalase geht also in den Rahm über. Im Gegensatze dazu ist die Oxydase in der Magermilch enthalten (Guajakolprobe = stark orangerot), während sie in dem Rahm fehlt (Guajakolprobe = schwach gelb). Katalase und Oxydase hemmen sich gegenseitig in ihren Wirkungen, denn

[1]) Smidt. Hygienische Rundschau 1904. cit n Buttenberg. Molk.-Ztg. Berlin 1906. Nr. 19 u. 20; ferner n. Milchw. Centralblatt Jahrg. 1. H. 2.

[2]) cf. P. Buttenberg: „Zur Untersuchung der pasteurisierten Milch." Ref. Molk. Ztg. Berlin 1906, Nr. 19 u. 20.

a) Magermilch + Rahm = schwächere Oxydasereaktion;
b) Magermilch + gekochte Milch (Katalase in letzterer zerstört) = stärkere Oxydasereaktion;
c) Rahm + Magermilch = schwächere Reduktion;
d) Rahm + gekochte Milch (Oxydase in dieser zerstört) = stärkere Reduktion.

Anhang.

Die oxydierenden Fermente in der Milch.

Nach den Angaben der aufgeführten Autoren und Versuchsansteller sind als Ursache der auf Oxydation beruhenden Farbenreaktionen die in pflanzlichen wie in tierischen Säften und auch in der Milch verbreiteten oxydativen Fermente, die sogenannten „Oxydasen" anzusehen. Unter diesen werden von Bourquelot[1]) zwei Gruppen unterschieden:

1. Die direkten Oxydasen oder Aeroxydasen. Sie entnehmen den Sauerstoff stets aus der Luft und übertragen ihn auf die oxydierbaren Substanzen (Guajaktinktur). Diese Fähigkeit geht durch Erhitzen verloren.

2. Die indirekten Fermente oder Anaeroxydasen. Diese geben bei Luftzutritt mit Guajaktinktur keine Blaufärbung, sondern reagieren erst bei Gegenwart eines Vermittlers, z. B. Wasserstoffsuperoxyd, aus welchem sie den Sauerstoff zur Oxydation entnehmen können. Wie der Name „Anaeroxydasen" besagt, findet die Oxydation sogar bei Abwesenheit von Luft statt. Auch die indirekten Oxydasen werden beim Erhitzen unwirksam.

Babcock, Russel und Vivian[2]) zeigten, dass das von ihnen in der Milch gefundene Enzym, die „Galaktase", ein dem Trypsin ähnlicher Stoff ist, welcher Wasserstoffsuperoxyd zersetzt und diese Eigenschaft bei 80° einbüsst.

Barthel gibt an, dass die Galaktase das einzige unter normalen Verhältnissen in der Milch vorkommende Ferment ist, das Wasserstoffsuperoxyd zersetzen kann. Dieses Enzym entstammt seiner Ansicht nach den Leukocyten oder weissen Blutkörperchen, bezw. es wird von diesen abgesondert.

Raudnitz[3]) führt die katalytische Wirkung der Milch auf ein besonderes, von ihm als „Superoxydase" bezeichnetes,Enzym zurück, dessen Wirkung durch Rhodansalze gehemmt wird. Dieses Ferment zersetzt Wasserstoffsuperoxyd und unterscheidet sich von dem die Guajakreaktion hervorrufenden Stoff wesentlich durch sein anderes Verhalten gegen Fällungsmittel.

O. Loew[4]) wies Wasserstoffsuperoxyd zersetzende Enzyme in verschiedenen pflanzlichen und tierischen Organen und Flüssigkeiten nach und belegt sie mit dem Sammelnamen „Katalase". Mit dieser erklärt

---

[1]) Bourquelot. cit. n. Neumann-Wender. Molk.-Ztg. Berlin 1903, 62 und n Milchztg. 1904, Nr. 26.

[2]) Babcock etc. n. Molk.-Ztg. Berlin 1900, 113; cf. auch Barthel, Milchztg. 1899, 487 u. Utz, ebenda 1903, 129.

[3]) Raudnitz. Zeitschr. f. Biologie 1901, 40, 91 cit. n. Neumann-Wender Molk.-Ztg. Berlin 1903, 63.

[4]) O. Loew. Report. 68. U. S. Dept. of Agr. 1901 cit. n. Neumann-Wender; cf. auch Jahresber. f. Agrik. Chemie 1902, 394.

er die Raudnitz'sche Superoxydase für identisch. Die Wirkung der Katalase unterscheidet sich nach seinen Untersuchungen von jener der Anaeroxydase wesentlich dadurch, dass erstere nur Peroxyde zu spalten, letztere aber den von den Peroxyden abgespaltenen Sauerstoff auf leicht oxydierbare Körper zu übertragen vermag, somit Oxydationen bewirkt.

Nach Seligmann[1]) gibt es drei Arten von fermentativer Reaktionsmöglichkeit:

1. Die Fähigkeit, Hyperoxyde in Wasser und Sauerstoff zu spalten. Sie beruht auf der Tätigkeit eines Enzymes, das mit Raudnitz „Superoxydase" genannt wird.

2. Die Fähigkeit, den Sauerstoff der Luft zu aktivieren, sodass er mit oxydierbaren Körpern Verbindungen eingeht. Sie beruht auf der Wirksamkeit eines Enzymes, das „Oxydase" genannt wird.

3. Die Fähigkeit, nur bei Gegenwart von Wasserstoffsuperoxyd diese Oxydation auszulösen: „indirekte Oxydase".

Die genannten Fermente kommen in der Milch vor und zeigen, wie alle Enzyme, die Eigenschaft, durch Hitze inaktiviert zu werden.

Neumann-Wender[2]) gelang es zwar nicht, den „aktiven Körper", der in der Milch nur in sehr geringen Mengen vorkommt, zu isolieren, jedoch beschäftigte er sich eingehend mit einer nach den Angaben von Babcock, Russel und Vivian dargestellten konzentrierten Lösung der Enzyme. Seinen Forschungen gemäss ist die Galaktase kein einheitlicher Körper, sondern besteht aus mehreren vergesellschaftet vorkommenden Enzymen, welche in verschiedener Weise tätig sind und bei verschiedener Temperaturhöhe ihre Wirksamkeit einbüssen. Diese Enzyme sind:

1. Das Milchtrypsin oder die Galaktase. Sie besitzt proteolytische Eigenschaften, wirkt auf Kaseïn lösend und wird bei 76° inaktiviert.

2. Die Milchkatalase. Diese zersetzt Wasserstoffsuperoxyd und verliert die Fähigkeit hierzu beim Erhitzen auf 80°.

3. Die Milchperoxydase. Sie ist eine Anaeroxydase, spaltet Sauerstoff aus Peroxyden ab und vermag ihn auf oxydierbare Körper zu übertragen. Dieses Enzym wirkt oxydierend und gibt mit Guajaktinktur und Wasserstoffsuperoxyd eine Blaufärbung. Es wird erst bei 83° unwirksam.

Ueber die Entstehung der Guajakbläuung bemerkt Neumann-Wender in seinem Referat „Der Mechanismus der Guajakreaktion"[3]) noch folgendes: „So wissen wir, dass für das Zustandekommen der Guajakreaktion nicht allein ein katalytisch wirksames Enzym erforderlich ist, welches das Hyperoxyd spaltet, sondern noch ein besonderes Enzym, welches den freigewordenen Sauerstoff auf die Guajakonsäure überträgt und die Reaktion vermittelt. Bei Abwesenheit dieser als Zwischenkörper (Amboceptor) fungierenden Peroxydase bleibt die Blaufärbung der Guajaktinktur aus."

---

[1]) Seligmann. Zeitschr. f. Hygiene u. Infektionskrankh. 1905, Bd. 50, Heft 1. c. n. Milchw. Centralbl. 1906, Nr. 1.

[2]) Neumann-Wender. Molk.-Ztg. Berlin 1903, 63.

[3]) Oesterr. Chem. Ztg. 1904. 7. 533. cit. n. Chem. Ztg. Coethen 1905. Nr. 44. (vergl. hierzu S. 21 u. 22 ff).

Der Guajakreaktion wäre hiernach folgender, der Storch'schen, Utz'schen, Dupouy'schen etc. Reaktion analoger Vorgang zu Grunde zu legen:

Aus den in reifer Guajaktinktur infolge der Autooxydation enthaltenen Peroxyden[1]) — an deren Stelle bei nicht reaktionsfähiger Tinktur ein Zusatz von Wasserstoffsuperoxyd zu treten hätte — wird durch fermentative Wirkung Sauerstoff abgespalten. Dieser wird weiterhin auf enzymatischem Wege auf die α = Guajakonsäure übertragen, hierdurch die Oxydation derselben und somit die Blaufärbung bedingt. (Anm. d. Verf.)

---

[1]) vergl. S. 21, 22 u. 13.



II. Teil.

Eigene Befunde.

Allgemeine Bemerkungen über die Anstellung der Versuche.

Von den geschilderten Reaktionen wurden folgende in den Kreis meiner Versuche gezogen und bezüglich ihrer Schärfe verglichen:

1. Die Guajakringprobe nach Arnold-Weber.
2. Das Guajakverfahren von Carcano.
3. Die Paraphenylendiaminreaktion nach Storch.
4. Das Storch'sche Verfahren in der Abänderung von Schaffer.
5. Die Ursolprobe von Utz unter Verwendung von
   a) der vorgeschriebenen alkoholischen Ursollösung nebst
      α. Utz'schem Wasserstoffsuperoxyd,
      β. festem und gelöstem Ammoniumpersulfat,
      γ. festem Kaliumperkarbonat;
   b) Ursol D und Kaliumperkarbonat in Substanz.
6. Das Verfahren von Richmond mit Metaphenylendiamin.
7. Die Storch'sche Reaktion mit Dimethylparaphenylendiamin.
8. Versuche mit Metadiamidobenzol.
9. Von den Reaktionen nach Dupouy: das Guajakol, Hydrochinon, Brenzkatechin, α = Naphtol und Paraphenylendiamin; zu ihnen wurde noch das Pyrogallol hinzugesellt.
10. Das Jodkaliumstärkeverfahren, und zwar
    a) nach der du Roi-Koehler'schen Vorschrift,
    b) in der Modifikation von Utz.
11. Die Schardinger'sche Methode.

Die Arnold-Mentzel'schen Reaktionen mit Paradiaethylparaphenylendiamin und Paradiamidophenylaminhydrochloricum habe ich nicht berücksichtigt, da nach Angabe der Autoren die Lösungen nur kurze Zeit sich halten und weil, wahrscheinlich aus den gleichen Gründen, eine Nachprüfung bislang nicht erfolgt ist.

Weiterhin wurde bei allen jenen Methoden, die eine Anwendung weniger Tropfen stark verdünnter Wasserstoffsuperoxydlösung erforderten, die letztere öfters erneuert. Ihre Schärfe wurde in der Weise nachgeprüft, dass im Reagensgläschen ein wenig Kaliumdichromat mit einigen Tropfen verdünnter Schwefelsäure angesäuert und mit etwas Wasserstoffsuperoxyd gemischt wurde. Die Wirksamkeit der Wasserstoffsuperoxydlösung kennzeichnet hierbei eine von entstehendem Ueberchromsäureanhydrit herrührende Blaufärbung, welche durch vorhergehenden Zusatz von etwas Aether ausgeschüttelt werden kann.

Um ein möglichst klares Bild von der Brauchbarkeit und der Schärfe der angewandten Reagentien gegenüber der zu prüfenden Milch zu bekommen, wurde diese in der verschiedenartigsten Beschaffenheit und in verschiedenen im Handel vorkommenden Fahrlässigkeiten und Fälschungen untersucht. Es wurden geprüft:

A. Rohe und gekochte Milch, und zwar wurde stets vor Beginn dieser Versuche, nach kräftigem Durchmischen der Milch, ein Teil von ihr längere Zeit der Siedetemperatur ausgesetzt bezw. zum öfteren Aufwallen gebracht.

B. Rohmilch mit geringeren und starken Wasserzusätzen, ebenso gekochte mit einer stärkeren Wassermenge verdünnte Milch.

C. Sterilisierte Milch, indem rohe Milch im Autoklave einem Druck von 0,5 Atmosphären (= ca 111°) auf die Dauer von etwa 15 Minuten ausgesetzt und darauf schnell abgekühlt wurde. Stärkere Temperaturen wurden vermieden, da die infolge ihrer Einwirkung entstehende Bräunung die Zersetzung der Milchsubstanz kennzeichnet, wie auch eine derartige Milch für den Konsum kaum in Betracht kommen dürfte.

D. Pasteurisierte Milch (vor dem Erhitzen als roh[1]) erkannt), welche, zur Vermeidung stärkeren Wachstums lebend gebliebener Bakterienarten bei ihrer Vermehrung günstigen Temperaturen (35 bis 37°), nach dem Erhitzen sofort auf 15° abgekühlt wurde. Bei den einzelnen Pasteurisiertemperaturen (nach Kirchner, Stohmann zwischen 65 bis 100°) wurde teilweise auch eine verschiedene Zeitdauer ihrer Einwirkung innegehalten, insbesondere bei jenen Temperaturhöhen, von welchen ab die einzelnen Reaktionen eine Trägheit im Eintritte bemerken liessen, oder die Färbung in verminderter Schärfe sich offenbarte. Da die gebräuchlichen Pasteurisierapparate in stärkerem oder geringerem Grade ungenau zu arbeiten pflegen, und da ihre Anwendung für die zur Untersuchung erforderlichen nur geringen Milchmengen zu kostspielig erschien, wurde das Pasteurisieren in folgender Weise ausgeführt: Die Milch wurde in einem entsprechend grossen Erlenmeyerkolben in ein geräumiges vorgewärmtes Wasserbad gestellt, und letzteres durch eine darunter befindliche Bunsenflamme, wie auch durch eine um den Erlenmeyerkolben gewundene und mit einem Dampfentwickler in Verbindung stehende Heizschlange erhitzt. Zur Beobachtung der zunehmenden Erwärmung der Milch diente ein, im Halse des Kolbens befestigtes und in die Milch hineinragendes, genau geprüftes Thermometer. Durch Regulierung der Flamme unter dem Wasserbade und unter dem Dampfentwickler liessen sich selbst für längere Zeit konstante Temperaturen herstellen, wie andererseits durch häufiges Umschütteln eine gleichmässige Erwärmung der Milch erzielt wurde.

Einige gekochte, wie die Mehrzahl der pasteurisierten nicht die Reaktion gebenden Milchproben wurden teils offen teils in kleinen, mit Wattebausch verschlossenen, sterilen Erlenmeyerkölbchen im Keller beiseite gestellt. Hierdurch wurde etwaigen wirkungsfähig gebliebenen Enzymen und Keimen Gelegenheit zum Auswachsen geboten, und dann nach Verlauf von Stunden und Tagen die in Frage kommende Milch bezüglich ihres Verhaltens zu den einzelnen Reagentien wiederholt nachgeprüft.

E. Mischmilch, hergestellt aus gekochter bezw. genügend pasteurisierter abgekühlter Milch und stärkeren wie geringeren Rohmilchzusätzen. Die nicht reagierenden Proben wurden ebenfalls in der oben erwähnten Weise für zu wiederholende Versuche zurückgestellt.

---

[1]) meist durch die Guajakringprobe, ferner auch durch die Storch'sche, Utz'sche und die Guajakolprobe.

F. Magermilch, sowohl rohe wie bis zum Ausbleiben der Reaktionen pasteurisierte; desgleichen gekochte Magermilch. Ebenso gelangten Gemische aus genügend erhitzter und kleineren Mengen roher Magermilch zur Prüfung.

G. Rahm, in rohem Zustande und nach dem Erhitzen bis zum Verlust des Reaktionsvermögens.

H. Buttermilch, sowohl vollkommen rohe, wie nach ungenügendem und starkem Erhitzen.

J. Molke, und zwar

a) Molke von roher, pasteurisierter und gekochter Voll- und Magermilch;

b) Molke aus den Gemischen stark erhitzter mit roher Vollmilch, wie genügend erhitzter mit roher Magermilch;

c) nachweislich rohe Molke nach ihrem Erhitzen auf höhere Grade sowie auch bis zur Kochtemperatur, und weiter in nicht reaktionsfähiger Beschaffenheit nach Zusätzen des rohen Produktes.

Auch mit Hilfe von Essigsäure und schwachem Erwärmen hergestellte Molke wurde berücksichtigt. —

Alle zur Untersuchung gelangende Milch wurde vor Entnahme der für die Reaktionen erforderlichen Proben kräftig durchmischt.

---

1. Die Guajakringprobe.

Infolge der vielfachen Bedenken, die über die Zuverlässigkeit der Guajakmischprobe laut geworden sind, und weil auch bei den eigenen Vorprüfungen dieMischreaktion sowohl anSicherheit wie namentlich an Intensität und Haltbarkeit der Schichtreaktion deutlich nachstand, habe ich bei den vorliegenden Versuchen lediglich die Guajakringprobe angewandt. Von der gleichzeitigen tropfenweisen Zugabe von Wasserstoffsuperoxyd wurde im allgemeinen abgesehen, denn es liegt gerade in dem Eintritt der Reaktion ohne dieses energische Oxydationsmittel der Vorzug des Guajakverfahrens vor den anderen Methoden. Nur bei negativem Ausfall der Prüfung, und hier namentlich bei Gemischen aus erhitzter und geringen Mengen roher Milch, habe ich derartigeVersuche zur Genüge angestellt.

Die benutzten Tinkturen, ihre Anfertigung und Aufbewahrung.

Abgesehen von 10 fertig erstandenen Guajakholz- und Guajakharztinkturen, die in erster Linie zu vergleichenden Versuchen dienten und einigen Aufschluss über das käufliche Material geben sollten, wurden sämtliche Tinkturen für die Probe selbst hergestellt; denn nur auf diese Weise konnte an eine befriedigende Lösung teilweise noch zweifelhafter Fragen herangegangen werden, wie

1. Ist die Guajakholz- oder die Harztinktur zur Milchprüfung geeigneter?

2. Ist der käufliche ca 94 bis 96%ige oder der nach der Pharmakopöe zum Ansatze von Holztinkturen meist verwandte 70%ige

Alkohol oder das Aceton das wirksamste Auszugsmittel, und welches ist das beste Konzentrationsverhältnis?

3. Wann werden die Guajaktinkturen reaktionsfähig, wann sind sie gebrauchsfertig, und wie lange währt ihre Reaktionsfähigkeit?

Da die Prüfungen über die Dauer der Gebrauchsfähigkeit sich auf Jahre erstrecken, und demgemäss ihre Ergebnisse in den Rahmen dieser Arbeit nicht eingefügt werden können, so werden alle nach Abschluss der Hauptversuche gebrauchsfähigen Guajaktinkturen in dem Landwirtschaftlichen Institut zu Königsberg von Zeit zu Zeit nachgeprüft und hierüber später an geeigneter Stelle berichtet werden.

Die Tinkturen wurden in Flaschen angesetzt, gut verkorkt und, um die normalen Verhältnisse zu wahren, im zerstreuten Tageslicht bei etwa 18 bis 22° C. gehalten. Von Zeit zu Zeit schüttelte ich die Ansätze kräftig durch und dekantierte sie in der Regel nach 10, seltener 7 Tagen. Die fertigen Guajaktinkturen werden gleichfalls vor dem Sonnenlichte geschützt aufbewahrt. Insgesamt wurden im Laufe der Zeit 120 Tinkturen hergestellt und in gewissen Zeiträumen geprüft. Nach der Art der Guajaksubstanz, des Extraktionsmittels und der Konzentration lassen sich diese Guajakauszüge folgendermassen ordnen:

A. Holztinkturen.

	Ansatz	Verhältnis	Anzahl
1.	Im Ansatz mit 70%-igem Alkohol	1 : 5	=64
	" " " " " "	1 : 10	= 5
	" " " " " "	1 : 20	= 3
2.	" " " 94 bis 96%-igem Alkohol	1 : 5	= 2
	" " " " " "	1 : 10	= 9
3.	" " " Aceton	1 : 5	= 6
	" " " "	1 : 10	= 7
	Summa =		96

B. Harztinkturen.

	Ansatz	Verhältnis	Anzahl
1.	Im Ansatz mit 70%-igem Alkohol	1 : 5	=10
	" " " " " "	1 : 10	= 3
2.	" " " 94 bis 96%-igem Alkohol	1 : 10	= 9
3.	" " " Aceton	1 : 10	= 2
	Summa =		24

Um eine genauere Kenntnis über die Brauchbarkeit der Guajaksubstanz zu gewinnen, wurde diese von verschiedenen Quellen bezogen. Zur Anfertigung aufgezählter 120 Tinkturen wurde daher nicht allein das Material fast sämtlicher Königsberger Apotheken und vieler Drogerieen benutzt, sondern auch eine grössere Zahl von Proben aus Versandgeschäften der verschiedensten Städte des Reiches beschafft. Denn, da die Guajaktinktur heute als Medikament eine nur untergeordnete Bedeutung hat, pflegt das zu ihrer Herstellung in kleineren Geschäften käufliche Material sehr alt zu sein. Infolgedessen ist es wohl denkbar, dass sich mit den Bestandteilen dieses viele Jahre, vielleicht Jahrzehnte hindurch lagernden Materials chemische Prozesse

abgespielt haben könnten, welche in die Tinktur übergehen und diese als Milchragens weniger geeignet machen. Dass dieser Umstand für en gros-Geschäfte, die ihr Material an die Apotheken und Drogerieen in stärkerem Masse absetzen, weniger zutrifft, liegt auf der Hand. Weiterhin ist das Guajakholz leicht erhältlich, während Guajakharzproben am hiesigen Orte nur mit Mühe aufgetrieben werden konnten.

Im ganzen wurden zu den Ansätzen der 120 Tinkturen verwandt

1. an Guajakholz aus Königsberger Bezugsquellen	=	49 Proben.
2. „ „ von auswärts	=	21 „
Summa	=	70 Proben.
3. an Guajakharz aus Königsberger Quellen	=	10 „
7. „ „ von auswärts	=	3 „
Summa	=	13 Proben.

Hiernach ist die Anzahl der Tinkturen grösser als die der Guajakproben. Dieses hat seine Ursache darin, dass einige der letzteren unter Verwendung der oben erwähnten Auszugsmittel zu mehreren Ansätzen, namentlich in verschiedenen Konzentrationen gebraucht worden sind. Denn nur auf diese Weise konnte ein genauerer Aufschluss über die Wirksamkeit des käuflichen 94 bis 96%igen wie des 70%igen Alkohols und des Acetons bei Guajakauszügen und über ein zweckmässiges Ansatzverhältnis erhalten werden.

Zu den 120 hergestellten Tinkturen kommen erwähnte 10 fertig erstandene Guajakauszüge, ferner 29 von 18 unbrauchbaren Tinkturen bereitete Verdünnungen hinzu, sodass insgesamt 159 Tinkturen geprüft wurden, eine Anzahl, wie sie bei der Guajakprobe noch nicht verwandt worden ist und zu Versuchszwecken vollauf genügen dürfte.

Die Ausführung der Ringprobe und die Beschaffenheit der Reaktion.

Zur Anstellung der Schichtprobe benutzte ich die in Laboratorien gebräuchlichen Reagensgläschen. In der Annahme, dass zum Zustandekommen der Reaktion ein gewisser Reichtum an Enzymen erforderlich, und in dieser Hinsicht die im Laufe der Zeit zur Untersuchung gelangenden Milchproben als individuell verschieden zu betrachten seien, wurden die Reagensgläser etwa 10 ccm hoch mit Milch gefüllt und in einem Reagensglasständer zur besseren Uebersicht neben einander geordnet. Hierauf wurde mittelst kleiner, und zwar für die einzelnen Tinkturarten besonderer Pipetten ein geringes Quantum Tinktur den Fläschchen entnommen und direkt auf die Oberfläche der Milchproben geträufelt, so dass die fallenden Tropfen die Wandung der Reagensgläser nicht berührten. Durch sanftes Hin- und Herbewegen der Gläschen liess sich die obere Milchschicht mit der Tinktur gut durchmischen und der Eintritt der Reaktion in den zur Beobachtung wieder im Ständer untergebrachten Proben beschleunigen, ohne die Intensität und die Haltbarkeit des entstandenen blauen Ringes ungünstig zu beeinflussen. Zu Beginn meiner Versuche hielt ich mich zunächst an den von Weber empfohlenen Zusatz von 3 bis 4 Tinkturtropfen. Da ich aber sofort, namentlich mit jüngeren reaktionsfähigen Tinkturen die Erfahrung machte, dass die blaue Zone häufig ausblieb oder sich in ihrem Eintritt erheblich verzögerte, während sie auf eine grössere

Tropfenzahl breit und deutlich erschien, habe ich von Holztinkturen mindestens 10 bis 12, von Harztinkturen nicht unter 8 und von ganz frischen Guajakauszügen sogar bis 20 Tropfen hinzugefügt. Blieb auch in solchem Falle die Reaktion aus, so wurde über letztgenannte Menge als zu hohen Tinkturaufwand nicht hinausgegangen. Es lassen sich somit genau bestimmte Normen für den Zusatz an Tinktur nicht aufstellen; vielmehr würde je nach dem Grade der Brauchbarkeit der Tinktur und dem Enzymgehalt der vorliegenden Milch das zur Herbeiführung einer tadellosen Reaktion erforderliche Tinkturquantum stets verschieden zu bemessen sein. Jedoch halte ich es nach meiner Erfahrung für notwendig, unter die erwähnte Anzahl von 12 Tropfen Holz- und 8 Tropfen Harztinktur in gebrauchsfähigem Zustande nicht zu gehen, denn bei dieser Menge tritt in jeder der Guajakreaktion überhaupt fähigen Milch die charakteristische Zone sicher genügend deutlich ein.

Die Farbe der Reaktion war beim Zusatz frischer Tinkturen ausgesprochen grün. Bei zunehmendem Alter der Auszüge zeigte sich ein Ueberhandnehmen der blauen Nüance, die bei gebrauchsfertigen Tinkturen einem deutlichen Blau, seltener Blaugrün Platz gemacht hatte. Ebenso abhängig von der Beschaffenheit der Tinktur und der Milch zeigte sich die Schnelligkeit, die Breite und die Haltbarkeit der Ringreaktion. Mit frischen Tinkturen oder bei stark erhitzter Milch mit geringen Rohmilchzusätzen und der zu ihrer Untersuchung nur anwendbaren älteren Tinktur war meist minutenlanges Warten bis zum Erscheinen einer sehr schmalen Zone erforderlich, während bei jeder rohen, selbst sauren Milch und gebrauchsfertigen Tinkturen fast durchweg in 5 bis 25 Sekunden, selten innerhalb 1 Minute und darüber, ein 2 bis 5 mm breiter Ring auftrat. Die Zonen ganz frisch reaktionsfähiger Tinkturen begannen nach dem Erscheinen sofort oder innerhalb weniger Sekunden zu verblassen. Eine sehr geringe Haltbarkeit der Zonen zeigten in der Regel auch die mit geringen Rohmilchmengen versetzten stark erhitzten Milchproben. Aeltere Guajakauszüge riefen in roher Milch 5 bis 10 Minuten beständige Färbungen, vollkommen gebrauchsfertige mindestens 15 Minuten und oft sogar stundenlange Sichtbarkeit der Zonen hervor.

Die Brauchbarkeit der Guajaktinkturen; insbesondere über den Eintritt der Reaktionsfähigkeit, den Zeitpunkt der Gebrauchsfertigkeit und die Dauer der Verwendbarkeit der selbsthergestellten Auszüge.

A. Die eigenen Ansätze.

Zur Beobachtung der Autooxydation wurden die angesetzten Tinkturen bis zur Dekantierung meist täglich, danach in der Regel mit Zwischenräumen von 5 bis 10 Tagen so lange mit Rohmilch geprüft, bis die Breite und Intensität der entstandenen Blaureaktion jegliches Bedenken hinsichtlich der Brauchbarkeit der einzelnen Guajaktinktur ausschloss, und letztere nicht nur zur Erkennung von vollkommen roher oder nicht genügend erhitzter süsser Milch, sondern auch von saurer Milch, Molke und vor allem von Mischmilch geeignet erschien. Wie

von vornherein anzunehmen war, erwiesen sich die einzelnen Guajakproben in ihren Ansätzen verschieden wirksam und der Eintritt der Reaktionsfähigkeit bei den jeweiligen Tinkturen und Auszugsmitteln durchaus wechselnd. Sehr günstig stellte sich das aus grossen Versandgeschäften bezogene Material, das vielfach schon innerhalb 5, spätestens aber mit 14 Tagen reaktionsfähig wurde, während die Ansätze der aus den Apotheken und kleineren Drogerieen stammenden Guajakproben seltener vor dem Dekantieren Anzeichen von Autooxydation gaben. Genau nach einem Jahre seit dem Ansatze der ersten Tinkturen wurden sämtliche Auszüge einer vorläufigen Abschlussprüfung unterzogen. Hierbei hatten die jüngsten Holztinkturen ein Alter von 6½, die letzten Harztinkturen ein solches von 5 Monaten erreicht.

I. Die Holztinkturen.

Hinsichtlich ihrer Beschaffenheit für die Tinkturbereitung liessen die in grob, fein und quadratisch geschnittenem, ferner in geraspeltem Zustande und selbst in Splittern angesetzten Holzproben keinerlei Unterschiede in ihrer Wirksamkeit erkennen. Desgleichen zeigte gereinigtes Guajakholz keine Vorzüge vor dem ungereinigten Material. Im besonderen wurde über die Brauchbarkeit der Guajakholztinkturen folgendes ermittelt:

1. Von 72 Tinkturen aus Guajakholz und 70%igem Alkohol gaben die Reaktion

im Alter von 3 bis 5 Tagen	=	28	Tinkturen	oder	38,9	%
„ „ „ 6 „ 10 „	=	9	„	„	12,5	„
„ „ „ 11 „ 15 „	=	18	„	„	25,0	„
„ „ „ 16 „ 20 „	=	16	„	„	22,2	„
„ „ „ 21 „ 25 „	=	1	„	„	1,4	„
Summa	=	72	„	„	100,0	„

Somit wurden sämtliche Ansätze von Guajakholz und 70%igem Alkohol reaktionsfähig, hiervon 37 oder 51,4 % bereits innerhalb des verhältnismässig kurzen Zeitraumes von 10 Tagen. Bezüglich des Eintrittes in die Autooxydation verhielten sich die Ansatzverhältnisse 1 : 5, 1 : 10 und 1 : 20 vollkommen gleich. Hingegen fielen die durch die Tinkturen 1 : 20 in den Anfangsstadien ihrer Reaktionsfähigkeit hervorgerufenen Färbungen schwächer aus als die Zonen gleichalteriger, zum Teil aus dem nämlichen Material hergestellter, stärkerer Konzentrationen. Zwischen den Ansätzen 1 : 5 und 1 : 10 konnte hinsichtlich des Verlaufes der Autooxydation und der Stärke der eintretenden Reaktion kein Unterschied bemerkt werden. Da ferner der bei 64 Tinkturen nach der Pharmakopöe mit 70%igem Alkohol im Verhältnis 1 : 5 hergestellte Auszug des Guajakholzes sich vollauf bewährte, so liegt meines Erachtens zur Bevorzugung der Konzentration 1 : 10 nicht der geringste Grund vor. Vielmehr lässt sich mit Bezug auf die grosse Zahl der reaktionsfähig gewordenen Tinkturen ziemlich sicher annehmen, dass jede nach der Pharmakopöe angesetzte und etwa 10 Tage zur Extraktion beiseite gestellte Holztinktur innerhalb 3 Wochen starke Zeichen zunehmender Reife gibt. Beim Alter der Tinkturen von 30 bis 40 Tagen waren die Zonen von genügender Breite,

Haltbarkeit und Farbenintensität, sodass derartige Auszüge ohne Bedenken in der Praxis verwandt werden können.

2. Von 11 Holztinkturen in 94 bis 96%igem Alkohol erwiesen sich reaktionsfähig

im	Alter	von	10 Tagen	= 0	Tinkturen
„	„	„	11 bis 15 Tagen	= 2	„
„	„	„	16 bis 20 „	= 2	„
„	„	„	21 bis 25 „	= 3	„
„	„	„	26 bis 30 „	= 2	„
„	„	„	31 bis 35 „	= 2	„
			Summa	= 11	Tinkturen
					oder 100 %.

Es trat demnach auch bei diesen Guajakholzansätzen überall die Autooxydation ein. Ferner zeigten die Konzentrationen 1 : 5 und 1 : 10 hinsichtlich des Eintrittes der Reaktions- und Gebrauchsfähigkeit gleichfalls keine Verschiedenheit. Indessen bewährte sich der konzentriertere Alkohol als Auszugsmittel nicht ganz so günstig wie der 70%ige. Denn obschon von gleichalterigen Auszügen desselben Guajakholzes mit 70%igem wie 94 bis 96%igem Alkohol, in entsprechenden Ansatzverhältnissen, einige der letzteren zur selben Zeit oder nur wenige Tage später die ersten Zeichen von Autooxydation ergaben, fanden sich auch solche Tinkturen, welche zum Eintritt der Reaktionsfähigkeit die doppelte Zeit brauchten als die mit 70%igem Alkohol gewonnenen Auszüge. So reagierte eine Holzprobe in letzterem Auszugsmittel schon nach 17 Tagen, mit dem konzentrierteren Alkohol dagegen erst im Alter von 32 Tagen. Hiernach muss von den Holztinkturen in 94 bis 96%igem Alkohol unbedingt ein höheres Alter für die Gebrauchsfertigkeit gefordert werden, indem diese erst mit etwa 40 bis 50, spätestens 60 Tagen gesichert erscheint.

3. Von 13 Holztinkturen in Aceton wurden während der Hauptversuche 11 oder 84,6 % mit 25 bis 35 Tagen reaktionsfähig. Eine Acetontinktur ging überhaupt nicht in Autooxydation, auch nicht bei mehrtägigem Stehen der verschlossenen Flasche im Sonnenlicht, trotzdem die aus derselben Holzprobe mit 70%igem wie auch 94—96%igem Alkohol angefertigten Auszüge — wenn auch in letzterem Falle in höherem Alter — durchaus gebrauchsfähig wurden. Die andere, ebenfalls schon als unbrauchbar beiseite gestellte Tinktur wurde im Alter von 6½ Monaten bei der Abschlussprüfung nochmals untersucht und gab nunmehr eine kräftige Reaktion. Von sämtlichen zur Bereitung der Acetontinkturen gedienten Holzproben waren auch Ansätze mit 70%igem Alkohol hergestellt worden. Unter diesen erwiesen sich 2 schon im Alter von 2 Tagen, 5 mit 7 Tagen und 6 nach 15 bis 18tägigem Stehen reaktionsfähig, also in sehr viel kürzerer Zeit als die entsprechenden Acetonansätze. Auch reagierten letztere in jüngerem Alter meist schwächer als die betreffenden Tinkturen in 70%igem Alkohol während des Anfangsstadiums der Autooxydation. Es ergibt sich schon aus diesen Vergleichen die geringere Bedeutung des Acetons als Auszugsmittel zur Genüge, indem unter seiner Verwendung hergestellte Tinkturen erst nach längerem, sogar bis monatelangem Stehen reaktionsfähig zu werden pflegen. Wichtiger ist aber

der Umstand, dass nicht jede — im Ansatz mit Alkohol brauchbare — Guajakholzprobe auch durch Aceton zur Wirksamkeit gebracht werden kann.

Hiernach ist es nicht ratsam, selbst in jüngerem Alter reaktionsfähig gewordene Holzacetontinkturen vor Ablauf von 60 Tagen (seit dem Ansatz) in Gebrauch zu nehmen, da erst dieses Alter bei schwächerem Verlauf der Autooxydation ein genügend kräftiges Auftreten der Reaktion gewährleistet.

Auch bei den Holz-Acetontinkturen unterschieden sich die Ansätze 1 : 5 von jenen 1 : 10 hinsichtlich der Brauchbarkeit während der Hauptversuche in keiner Weise. —

Abgesehen von den wenigen Misserfolgen mit Aceton, ist demnach die Reaktionsfähigkeit der Guajakholzansätze als eine ausserordentlich günstige zu bezeichnen. Auch behielten, wie folgende Tabelle zeigt, die im Laufe der Hauptversuche zur Reife gelangten Holztinkturen ihre Gebrauchsfähigkeit bis zur Schlussprüfung ausnahmslos bei.

Von insgesamt 96 Holztinkturen waren:

Zahl der Ansätze mit	A. Inmitten der Versuche			B. Bei der Schlussprüfung (1 Jahr n. d. ersten Tinkturansatz)				
	Reaktionsfähig		Nicht reaktionsfähig	Reaktionsfähig		Nicht reaktionsfähig	+ od. — reaktionsfähig	
	an Zahl	in %	anZahl	an Zahl	in %	anZahl	an Zahl	in %
a) 70%-igem Alkohol = 72	72	100	0	72	100	0	0	0
b) 94 bis 96%-igem Alkohol = 11	11	100	0	11	100	0	0	0
c) Aceton = 13	11	84,6	2	12	92,3	1	+ 1	+ 7,7
Summa = 96								

Hierzu ist zu bemerken:

ad a. Sämtliche mit 70%igem Alkohol gewonnenen Holztinkturen gaben bei der Abschlussprüfung die Reaktion durchaus kräftig. Hierbei zeigten sich die jüngsten Tinkturen im Alter von ½ Iahre genau so wirksam wie die ersten, 12 Monate alten Ansätze, sodass auch ihre Gebrauchsfähigkeit zum mindesten für Jahresfrist und weiterhin für vorläufig noch unabsehbare Zeit gesichert erscheint.

ad b. Die Tinkturen in 94 bis 96%igem Alkohol reagierten gleichfalls bei der Schlussprobe zu 100 % unverändert kräftig wie inmitten der Hauptversuche. Ueberhaupt unterschieden sie sich nach erlangter Gebrauchsfähigkeit hinsichtlich der Beschaffenheit der Reaktion von den Guajakholzauszügen des verdünnten Alkohols nicht. Für die Dauer ihrer Anwendbarkeit gelten demnach die für diese Tinkturen gemachten Bemerkungen.

ad c. Die gesamte Reaktionsfähigkeit der Holzacetontinkturen hatte sich bis zur Schlussprüfung um 1 zu dieser Zeit 6½ Monate

alte Tinktur (oder 7,7 % der Guajakholz-Acetonansätze), welche innerhalb der ersten 40 Tage nicht in Autooxydation gegangen war, vermehrt. Von den Holz-Acetontinkturen 1 : 10 gab eine im Alter von 1 Jahre die Zonenprobe nur noch schwach und nur auf Zusatz einer grösseren Tropfenzahl von ihr; andere, 6 Monate alte, riefen ebenfalls schwächere Reaktionen hervor als gleichalterige Acetontinkturen 1 : 5 und vor allem die aus denselben Holzproben mit 70 %igem Alkohol gewonnenen Auszüge. Desgleichen war die Haltbarkeit dieser schwächeren Reaktionen gering, und letztere nur etwa 5 bis 7 Minuten sichtbar. Die Zonen der Holz-Acetontinkturen 1 :5 fielen bei dem Schlussversuch noch kräftig aus. Hiernach kann auch hinsichtlich der Dauer der Gebrauchsfähigkeit den Ansätzen des Guajakholzes in Aceton im Vergleich mit den Alkoholtinkturen kein Vorzug nachgewiesen werden.

Die mithin unter den Guajakholzauszügen allein in Betracht kommenden und für die Milchprüfung durchaus brauchbaren Alkoholtinkturen haben in gebrauchsfertigem Zustande eine dunkel- bis hellbraunrote durchscheinende Farbe. Die Holz-Acetontinkturen sind ebenfalls durchscheinend, aber von hellerem, gelbem bis gelbrötlichem Aussehen.

II. Die Harztinkturen.

Das zur Herstellung der Harztinkturen verwendete Harzmaterial unterschied sich hinsichtlich seiner Brauchbarkeit in zwei, wesentlich von einander verschiedene Sorten, nämlich

1. in fertig pulverisiert käufliches Guajakharz, von grüner bis grüngrauer Farbe, und

2. das Guajakharz „in massa“, von dunkelgrünbraunem bis grünschwarzem, im Bruche rötlichbraunem Aussehen.

Zur Anfertigung oben angeführter 24 Harztinkturen dienten insgesamt 13 Harzproben, nämlich 5 fertig pulverisiert erstandene und 8 Sorten in massa. Letztere wurden zu den Ansätzen im Mörser zerrieben.

Von den 5 verschiedenen Harzpulvern gelangte nur ein einziges, welches im Gegensatz zu den vier anderen, unbrauchbaren und dunkelgrüngrau gefärbten, ein hellgrünes Aussehen hatte, sowohl im Ansatze mit 70%igem (1 : 5) wie 94 bis 96%igem (1 : 10) Alkohol zur Wirksamkeit, und zwar die Tinktur des konzentrierteren Alkohols nach 1 Monat, die des verdünnten dagegen schon in 15 bis 18 Tagen. Letztere Tinktur versagte indes bereits nach 4 Monaten, wogegen der Auszug mit dem stärkeren Alkohol noch nach 7 Monaten die Reaktion gab und sich erst nach Jahresfrist als unbrauchbar erwies. Es machte also auf der einen Seite die aus diesem Harzpulver mit 70%igem Alkohol gewonnene Tinktur die Autooxydation viel schneller durch, während sie andererseits die Brauchbarkeit in wesentlich kürzerer Zeit verlor als der fragliche Auszug des 94 bis 96%igen Alkohols.

Die Harzproben in massa erwiesen sich sämtlich in Tinkturansätzen wirksam. Hierbei kann die Konzentration des Alkohols und das Ansatzverhältnis bisweilen eine absonderliche Rolle spielen. Denn, während gleiche Guajakholzproben sowohl in dem konzentrierteren wie auch in dem verdünnten Alkohol und ohne Rücksicht auf das Ansatz-

verhältnis ausnahmslos reaktionsfähig und brauchbar wurden, und sich auch beim Guajakharze dieses als die Regel erwies, ging von 2 Fällen die eine Harzprobe nur mit 94 bis 96%igem Alkohol (1 : 10) in Autooxydation, in 70%igem (1 : 5) dagegen nicht; die zweite Harzprobe zeigte das umgekehrte Verhalten.

Das Aceton wurde, da es sich beim Guajakholz als schlechteres Auszugsmittel erwiesen hatte, nur bei 2 Harzsorten zur Tinkturbereitung verwandt. Der Auszug der einen Harzprobe (in massa) brachte es dabei um 3 Tage früher zur Reaktionsfähigkeit als eine aus dem gleichen Material mit dem 94 bis 96%igen Alkohol hergestellteTinktur, der andere (aus pulverisiert erstandenem Harze) hingegen ebenso wenig wie der ebenfalls zu Versuchen damit benutzte 70%ige und 94 bis 96%ige Alkohol.

Schaer[1]) hat darauf hingewiesen, dass der sogenannte Schweelprozess, durch den das rohe Guajakharz des Handels meist gewonnen wird, Zersetzungen der Harzbestandteile und hierdurch eine Verminderung der wirksamen Substanz herbeiführt. Hager[2]) hält nur das natürliche Guajakharz als Ozonreagens für geeignet. Nach ihm gibt natürliches Harz beim Zerreiben ein hellgraues Pulver, gereinigtes dagegen ein dunkelbraungraues. Zur genaueren Unterscheidung beider Harzarten empfiehlt Hager ferner folgende Methoden:

a) Wird ein erbsengrosses Stück des Harzes im Porzellanschälchen zu Pulver zerdrückt, zunächst mit 10 Tropfen Terpentinöl, dann mit 15 Tropfen absolutem Weingeist versetzt und an einem dunklen Orte umgerührt, so zeigt sich natürliches Guajakharz von einer gelben Flüssigkeit überschichtet, welche an einem schattigen Orte noch nach 30 bis 40 Minuten keine Verfärbung aufweist. Bei gereinigtem Harze färbt sich die über demselben befindliche Flüssigkeit nach 1 bis 3 Minuten dunkelblau oder violettblau.

b) 0,15 g zerriebenes Harz in 5 g absolutem Weingeist gelöst und im Schatten filtriert, gibt eine Lösung, welche nach Zusatz von 10 Tropfen Terpentinöl bei gereinigtem Harze eine dunkle, nach 1 bis 2 Minuten dunkelblau werdende, bei natürlichem eine gelbe, auch nach vielen Stunden und beim Erwärmen gelb bleibende Mischung entstehen lässt. Ein Harz, welches bei dieser Probe im Verlauf von ½ Stunde bezw. selbst nach dem Erwärmen eine bläuliche oder blaue Farbe erscheinen lässt, ist entweder durch Wärme oder Sonnenlicht verändert oder gereinigtes Guajakharz.

Um zu ermitteln, wie sich das Harzpulver des Handels und das Guajakharz in massa zu diesen Reaktionen stellt, wurde beiderlei von den Ansätzen übriggebliebenes Material der Hager'schen Probe unterworfen.

1. Von 4 hinzugezogenen Harzproben in massa hatten 3 nach dem Zerreiben ein gelbbraunes, 1 ein gelbliches Aussehen. Bei Ausführung

---

[1]) Schaer. Forschungsberichte Bd. III., p. 5. cit. n. Zink Milchztg. 1903, Nr. 13 u. 14.

[2]) Hager. Zeitschr. f. Analyt. Chemie 26, 261. cit. n. Pharm. Centralhalle 27, 522.

des „Verfahrens a“ zeigte sich unter Verwendung von gereinigtem aetherischem Terpentinöl innerhalb der vorgeschriebenen Beobachtungszeit von einer ¾ Stunde keine Verfärbung der gelblichen bis gelbbraunen überstehenden Flüssigkeiten. Gleich günstige Resultate lieferten die mit der — meines Erachtens zweckmässigeren — „Methode b“ ausgeführten Kontrollversuche. Hier hatten die aus dem zerriebenen Material mit absolutem Weingeist gewonnenen Auszüge bei 3 Harzsorten eine hellbraune, bei 1 Harzprobe eine gelbe Farbe. Nach vorschriftsmässiger Filtration zeigte sich sowohl mit gereinigtem aetherischem als auch mit dem gewöhnlichen Terpentinöl des Handels weder innerhalb weniger Minuten und Stunden noch bei ein bis zweitägigem Stehen irgend eine Spur von Reaktion in den an dunklem Orte aufbewahrten Gemischen.

2. Das dunkelgrüne, fertig pulverisiert erstandene und in Tinkturansätzen unbrauchbare Harz lieferte nach dem „Verfahren b“ mit absolutem Weingeist einen braunen Auszug. Dieser nahm im Gegensatze zu dem Harze in massa mit dem gewöhnlichen, wie auch mit dem gereinigten Terpentinöl in 1 Minute eine grünblaue, innerhalb 5 Minuten in Marineblau übergehende Färbung an. Leztere hatte nach Verlauf eines Tages der braunen Farbe wieder Platz gemacht.

Nach diesen Ergebnissen liegt der Verdacht eines stattgehabten Reinigungsprozesses vor allem bei dem käuflichen Guajakharzpulver vor, bezw. kann dasselbe infolge der losen Beschaffenheit und hohen Alters seine Wirksamkeit allmählich verloren haben. Das Material in massa hingegen scheint dem von Hager für Reaktionszwecke geforderten Guajakharz mehr zu entsprechen, wiewohl auch hier einzelne Lieferungen — nach Aufschriften der Firmen wie „Resina Guajaci extrafein in massa“ zu schliessen — Misstrauen aufkommen lassen.

Aus der Zahl der angesetzten Harztinkturen erlangten die Reaktionsfähigkeit:

1. Von 13 Ansätzen in 70%igem Alkohol nur 8 oder 61,5 % dieser Auszüge, und zwar

im Alter von 1 bis 5 Tagen = 5 Tinkturen,
„ „ „ 6 „ 10 „ = 1 „ ,
„ „ „ 15 „ 18 „ = 2 „ .

Bezüglich der Schnelligkeit des Eintrittes in die Autooxydation lassen demnach die mit 70%igem Alkohol gewonnenen Harzauszüge mit Guajakholztinkturen desselben Auszugsmittels keine Unterschiede erkennen. Dagegen waren sie hinsichtlich der Stärke der in Rohmilch erzeugten Zonen etwas früher gebrauchsfertig, etwa mit 20 bis 30 Tagen. Nur eine aus der bereits erwähnten fertigen hellgrünen Harzpulverprobe dargestellte Tinktur erforderte ein 40tägiges Stehenlassen. Ferner wurde bei aus gleichem Harzmaterial im Verhältnis 1 : 5, wie 1 : 10 gefertigten Ansätzen in einem Falle ein um 2 Tage früherer Eintritt der Reaktionsfähigkeit in dem Auszug 1 : 10 festgestellt. Auch bewirkten die geringeren Harzkonzentrationen in jungem Alter ein früheres und kräftigeres Zustandekommen der Ringreaktion als die Tinkturen des Ansatzverhältnisses 1 : 5.

2. Von 9 Ansätzen mit 94 bis 96%igem Alkohol im Konzentrationsgrade 1 : 10 nur 5 Tinkturen oder 55,6 % der in diese Kategorie gehörenden Auszüge, nämlich

4 Tinkturen im Alter von 10 bis 15 Tagen,
1 „ „ „ „ 30 „ 35 „ .

Letztere Tinktur war aus pulverisiert gekauftem Harze bereitet und wurde erst mit ca. 50 Tagen gebrauchsfertig, die anderen aus Guajakharz in massa jedoch, in gleicher Weise wie die Harztinkturen in 70%igem Alkohol, schon im Alter von 20 bis 30 Tagen.

3. Von 2 Harz-Acetontinkturen im Ansatzverhältnis 1 : 10 nur eine aus Guajakharz in massa mit 11 Tagen, und zwar um 3 Tage früher als der aus der nämlichen Probe mit 94 bis 96%igem Alkohol hergestellte Auszug. Jedoch gab diese Acetontinktur in den ersten Stadien ihrer Reaktionsfähigkeit zwar deutliche, aber dafür schwächere Reaktionen als die Harz-Alkoholtinktur, deren Zonen von Anfang an ziemlich stark ausfielen, und war aus diesem Grunde erst 10 Tage später, etwa im Alter von 40 Tagen, als gebrauchsfertig zu bezeichnen. Eine zweite dem pulverisierten Material des Handels entstammende Acetontinktur gelangte überhaupt nicht zur Reaktionsfähigkeit.

In ähnlicher Weise mangelhaft, wie der Eintritt der Reaktionsfähigkeit bei den Harztinkturen überhaupt, erwies sich auch die Dauer ihrer Gebrauchsfähigkeit. Von den oxydierten Harztinkturen waren:

Gesamtzahl der Ansätze mit	A. Inmitten der Versuche			B. Bei der Abschlussprüfung (1 Jahr nach dem ersten Tinkturansatz)				
	Reaktionsfähig		Unbrauchbar	Reaktionsfähig		Unbrauchbar	+ od. — reaktionsfähig	
	an Zahl	in %		an Zahl	in %		an Zahl	in %
a) 70%-igem Alkohol = 13	7	53,8	6	6	46,2	7	— 1	— 7,6
b) 94 bis 96%igem Alkohol = 9	5	55,6	4	4	44,4	5	— 1	—11,2
c) Aceton = 2	1	50,0	1	1	50,0	1	0	0

ad a. Unter den 8 wirksam gewordenen Tinkturen des 70%igen Alkohols büsste ein aus fertig pulverisiert erstandenem Material angefertigter Auszug die Reaktionsfähigkeit bereits während der Hauptversuche im Alter von 4 Monaten gänzlich ein. Bei den Schlussversuchen zeigte sich ein Defizit bei den 3 mit Guajakharz in massa im Verhältnis 1 : 5 angesetzten und nunmehr 5 Monate alten Tinkturen. Von ihnen reagierte eine einzige noch stark, die zweite gab nur ganz schwache und die dritte überhaupt keine Spuren von Reaktion mehr. Die gleichalterigen Konzentrationen 1 : 10 der fraglichen Harzproben waren dagegen noch alle kräftig wirksam.

ad b. Innerhalb der Reihe der reaktionsfähig gewordenen, mit 94 bis 96%igem Alkohol gewonnenen Harzauszüge trat während der

Hauptversuche keinerlei Veränderung ein. Bei der Abschlussprüfung hatten diese Tinkturen alle ein Alter von 1 Jahre. Nur die aus dem pulverisierten Handelsprodukt angefertigte Tinktur war inzwischen unbrauchbar geworden; die anderen aus Guajakharz in massa erwiesen sich dagegen noch alle wirksam.

Trotzdem sich also sowohl Ansätze des 70%igen als auch besonders des konzentrierteren Alkohols mit dem Guajakharz in massa im Verhältnis 1 : 10 bei Jahresfrist noch brauchbar zeigten, scheint in Rücksicht auf die angeführten Misserfolge auch bei den Harzproben in massa auf eine lange Gebrauchsfähigkeit daraus gewonnener Tinkturen kein grosser Verlass zu sein.

ad c. Die in Autooxydation gegangene Harz-Acetontinktur hatte im Alter von 12 Monaten ihre Wirksamkeit noch nicht eingebüsst. —

Aeltere, und zwar sowohl gebrauchsfähige wie unbrauchbare Harztinkturen in Alkohol haben in der Regel eine schwarzbraunrote undurchsichtige Färbung, doch fanden sich unter den Ansätzen auch 2 von der braunroten durchscheinenden Farbe der Holztinkturen und vorzüglicher Reaktionsfähigkeit. Harz-Acetonauszüge sind braunrot und durchsichtig.

Ein zwischen Guajakholz- und Harztinkturen gezogener Vergleich spricht demnach mit grösster Deutlichkeit für den Vorzug der ersteren, und zwar liegen die wesentlichen Nachteile für die Anwendung von Harztinkturen

a) in der mangelhaften Reaktionsfähigkeit der käuflichen Harzprodukte,
b) in der geringeren bezw. unsicheren Dauer der Gebrauchsfähigkeit der Harztinkturen.

Auch erstreckt sich bei den Harzauszügen das Defizit auf alle 3 Auszugsmittel, während sich beim Guajakholz nur 1 Ansatz in Aceton als unbrauchbar erweist. Hingegen ist der Alkohol, vor allem der 70%ige als sicher wirkendes Extraktionsmittel zur Gewinnung gebrauchsfähiger Holztinkturen zu betrachten.

Im besonderen lassen sich für die Herstellung von Harztinkturen nach den gemachten Erfahrungen noch folgende Regeln aufstellen:

1. Nur das Guajakharz in massa eignet sich für die Anfertigung von Tinkturen zu Reaktionszwecken. Das Zerkleinern desselben zu Pulver hat zur Vermeidung von Oxydationsprozessen erst kurz vor dem Ansatze zu erfolgen. Indessen ist auch bei den aus solchem Material gewonnenen Tinkturen der Eintritt der Reaktionsfähigkeit nicht in jedem Falle gesichert. Unbrauchbar ist dagegen das pulverisierte Harz des Handels, da gerade bei ihm der Verdacht eines Reinigungsprozesses resp. durch Oxydationsvorgänge hervorgerufener Unwirksamkeit vorliegt.

2. Es ist vor jedem Ansatze empfehlenswert, das vorliegende Harz nach den Hager'schen Vorschriften auf seine Brauchbarkeit für Reaktionszwecke zu prüfen.

3. Der 70%ige Alkohol bietet als Auszugsmittel für Guajakharz vor dem 94 bis 96%igen keinerlei Vorzüge, wohl aber erhält bisweilen der konzentriertere in den mit ihm angesetzten Tinkturen die Gebrauchsfähigkeit für längere Zeit.

4. Die Dauer der Gebrauchs- wie Reaktionsfähigkeit ist bei den Harztinkturen durchaus wechselnd, und bei der Ungleichheit des Ausgangsmaterials irgend eine Gesetzmässigkeit über jene selbst für den Zeitraum eines Jahres nicht abzuleiten. Vor allem erscheint das Anhalten der Wirksamkeit auch an eine nicht zu starke Konzentration der Harztinkturen geknüpft. Stärkere Ansätze als im Verhältnis 1 : 10 neigen zu baldigem Verlust der Gebrauchsfähigkeit; Harztinkturen mit 94 bis 96%igem Alkohol in dieser Konzentration können sich nach Jahresfrist noch unverändert brauchbar erweisen.

5. In Alkohol unwirksame Harzproben vermag auch das Aceton nicht in Autooxydation zu bringen.

6. Zur Vermeidung von Fehlschlüssen sind reaktionsfähige Harztinkturen des öfteren auf den Grad ihrer Brauchbarkeit zu prüfen.

B. Die fertig in Gebrauch genommenen Guajaktinkturen.

Beim Einkauf fertiger Tinkturen, welche für Vergleichszwecke dienen sollten, wurden nur Auszüge mit Alkohol berücksichtigt, weil die sonst noch im Handel erhältliche ammoniakalische sowie die fenchelhaltige Guajaktinktur bereits von Glage verworfen worden sind.

1. Guajakholztinkturen.

Von 4 fertigen Holzauszügen hatten 3 eine durchscheinende braunrote, die vierte eine tief schwarzbraunrote undurchsichtige Farbe. Letztere war, wie ich vom Verkäufer erfuhr, etwa 10 Jahre alt und erwies sich bei mehrmaliger Prüfung mit verschiedenen Rohmilchproben als gänzlich unbrauchbar. Hiernach findet die Angabe Webers, dass nur Holztinkturen von durchsichtiger Färbung zur Milchuntersuchung tauglich seien, ihre Bestätigung. Unter den durchscheinenden heller braunroten Auszügen war der eine bei Ingebrauchnahme 2 Monate alt, desgleichen der zweite nach Mitteilung zwar unbekannten, jedoch jüngeren Alters, während bei dem dritten der Alterszustand nicht festgestellt werden konnte. Sämtliche 3 Tinkturen zeigten sich bei Vergleichsversuchen in allen jenen Fällen, in welchen die selbsthergestellten Guajakholzauszüge die Reaktion hervorbrachten, von derselben Wirksamkeit wie diese und waren auch bei der Abschlussprüfung, als die eine Tinktur bereits 8 Monate alt war, genau so kräftig wie beim Einreihen in die Versuche.

2. Guajakharztinkturen.

Die aus 6 verschiedenen Quellen bezogenen Harztinkturen hatten durchweg eine tief schwarzbraunrote ganz undurchsichtige Farbe. Genauere Angaben über die seit der Herstellung dieser Auszüge verflossene Zeit waren nicht zu ermitteln, ausser das 4 Tinkturen als sehr alt bezeichnet wurden. Wie demgemäss anzunehmen war, gaben denn die 6 Harztinkturen in keinem Falle auch nur das geringste Zeichen von Reaktionsfähigkeit. Drei von ihnen wurden ausserdem mehrere Tage geöffnet der Einwirkung des Sonnenlichtes und der Luft ausgesetzt. Nach zehntägigem Stehen lieferte die eine stark grünblaue Spuren der Ringreaktion, die anderen blieben in der gleichen Frist und

auch nach vierzehntägigem Stehen ebenso unbrauchbar wie zuvor. Mithin sind selbst von einer derartigen Behandlung alter unbrauchbarer Harztinkturen keine Vorteile zu erwarten. —

Es soll an dieser Stelle nicht unerwähnt bleiben, dass die käuflichen Tinkturen häufig aus Flaschen verabfolgt werden, welche nur die Etikette „Tinctura Guajaci“ tragen. Die Pharmac. Germ. I gibt nun für die Harztinktur die Bezeichnung „Tinctura Guajaci“. Für die Guajakholztinktur gilt dagegen die Aufschrift „Tinctura Guajaci ligni.“ Demnach sind die in den Apotheken erhältlichen Tinkturen, soweit sie mit „Tinctura Guajaci“ signiert sind, Harztinkturen und mit den Holzauszügen, welche mit den Jahren eine gleiche Beschaffenheit erlangen, d. h. verharzen, nicht zu verwechseln. In Rücksicht auf die käuflichen Tinkturen kann daher auch ich nur folgende von anderer Seite aufgestellte Forderungen unterstützen:

a) Vor dem Einkauf fertiger Guajakharztinkturen ist wegen ihrer zweifelhaften Reaktionsfähigkeit zu warnen.
b) Bei Vorhandensein der ausdrücklich zu fordernden und als solche erwiesenen Guajakholztinktur erkundige man sich vor allem nach ihrem Alter und weise jede schwarzbraunrote und undurchsichtige zurück.
c) Es ist in jedem Falle geboten, sich mit roher Milch von einer guten Reaktionsfähigkeit der zu kaufenden Holztinktur vorerst zu überzeugen.

C. Versuche mit aus unbrauchbaren Guajaktinkturen hergestellten Verdünnungen.

In der Annahme, dass vielleicht eine zu starke Konzentration — insbesondere bei Harztinkturen — Unbrauchbarkeit bei den Guajakauszügen verursache, wurde von einigen nicht tauglichen Harzauszügen in Alkohol eine Wenigkeit mit einer grösseren Menge 70%igen Alkohols in Reagensgläschen kräftig geschüttelt. Die so entstandenen Verdünnungen wurden sofort geprüft und lieferten nunmehr beim Ueberschichten roher Milch teils starke Zeichen von Reaktionsfähigkeit in Form grünblauer Flecke, teils sogar eine schwache grüne bis grünbläuliche Ringfärbung. Infolgedessen wurden von 18 überhaupt nicht reaktionsfähigen oder mittlerweile unbrauchbar gewordenen Guajaktinkturen, und zwar von 1 Holz- und 15 Harztinkturen in Alkohol sowie von 1 Harz- und 1 Holztinktur in Aceton, insgesamt 29 Verdünnungen hergestellt. Zur Verminderung der Konzentration wurde bei den alkoholischen Auszügen 70%iger Alkohol, bei den mit Aceton gewonnenen dieses letztere Extraktionsmittel zu genau abgemessenen Tinkturmengen im einfachen bis hinauf zum zwanzigfachen Volumen zugesetzt, so dass bei einzelnen Tinkturen verschiedene Verdünnungsgrade auf ihre Wirksamkeit zu beobachten waren.

Unter diesen 29 Verdünnungen reagierten von 2 Holztinkturen keine, von 27 Harztinkturen nur 10 oder 34.5 % des ganzen Verdünnungsansatzes, und zwar nur alkoholische. Die Reaktionsfähigkeit zeigte sich dabei teils sofort teils innerhalb 14 Tagen, ohne jedoch an eine bestimmte Konzentration geknüpft zu sein. Ferner war sie in den meisten Fällen äusserst schwach, bezw. wurde sie nirgends so stark,

Tabellen zur Guajakringprobe.

(C bis F).



dass die betreffende Tinktur in der Praxis hätte Verwendung finden können. Desgleichen schwanden die Zeichen der Autooxydation bei einigen Verdünnungen schon wieder binnen wenigen Tagen oder Wochen, sodass im Alter von 5 Monaten nur mehr 4, bei dem Abschluss der Arbeiten im Alter von 9 Monaten nur noch 2 dieser Tinkturen Reaktionen gaben.

Man wird demnach, wo das der Tinktur zu Grunde liegende Material schon im ersten Ansatze sich garnicht oder nur mangelhaft bewährte, auch mit Verdünnungen nur negative oder unwesentliche Ergebnisse erreichen.

Die Zuverlässigkeit der Guajakringprobe bei der Milchuntersuchung.

Meine Versuche mit der oben[1]) beschriebenen Ausführungsform der Guajakringprobe lieferten sowohl bei Vollmilch in verschiedenartigster Beschaffenheit als auch bei Magermilch, Rahm, Buttermilch und Molke unter entsprechenden Verhältnissen Ergebnisse, welche zweifellos für die Brauchbarkeit des Arnold-Weber'schen Schichtverfahrens sprechen. Die Kontrolle wurde durchschnittlich auf 30 Minuten ausgedehnt, in besonders unsicheren Fällen dagegen stundenlang auf das Erscheinen der blauen Zone gewartet. Die ausgeführten Reaktionen samt dem Zeitpunkt ihres Eintrittes finden sich in Tabelle C bis F summarisch zusammengestellt.

Zu diesen Tabellen seien ferner noch folgende Erläuterungen hinzugefügt:

1. ad Vollmilch.

Einschliesslich der Milch, welche zur Feststellung des Beginnes der Reaktionsfähigkeit bei den Tinkturansätzen gedient hatte, wurden ca. 80 verschiedene Rohmilchproben auf die Guajakreaktion geprüft. Hierbei wurden mit der gesamten Milch und sämtlichen brauchbaren Guajaktinkturen über 650 deutliche Zonen erhalten.

Vollkommen rohe Milch liess sich schon mit jungen, eben reaktionsfähig gewordenen Tinkturen in 3 bis 10 Minuten deutlich erkennen; mittelst den in der Praxis nur anwendbaren gebrauchsfertigen Guajakauszügen erfolgte ausnahmslos eine kräftige Ringfärbung meist in wenigen Sekunden, selten erst in 1 Minute und darüber.

Verdünnung mit Wasser vermochte das Reaktionsvermögen der Rohmilch nicht zu unterdrücken, vielmehr rief letztere selbst bei 50 und 75 % Wasserzusatz (mit 50 Guajaktinkturen) sehr intensive Zonen hervor. Ferner wuchs die Breite des blauen Ringes mit zunehmendem Wassergehalt und betrug oft $\frac{1}{2}$ bis 1 cm und darüber. Im Gegensatze dazu verminderte sich die Haltbarkeit der Ringform, indem bei sehr starker Verdünnung mit Wasser die blauen Zonen teilweise sich langsam mit der Flüssigkeit vermischten. Immerhin war die Blaufärbung auch in verwässerter Milch vielfach nach $\frac{1}{2}$ bis 1 Stunde noch deutlich sichtbar.

Mässig pasteurisierte Milch erzeugte die Reaktion ebenso schnell und kräftig wie rohe. Dagegen änderte sich ihr Verhalten stets mit

[1]) cf. S. 59 ff.

dem Pasteurisieren auf 75°. War eine Milch auf diese Temperatur eben gebracht worden, so erfolgte die Reaktion in der Mehrzahl der Fälle noch schnell und intensiv; andererseits liessen einzelne derartige Proben bereits eine gewisse Reaktiosträgheit und die an sich recht deutliche, aber schwächere Zone erst in 1½ bis 3 Minuten erkennen. 1 Minute bei 75° pasteurisierte Milch reagierte nach der sofort erfolgten Abkühlung nicht, vermochte aber stets nach etwa 12 bis 24 Stunden eine matte Reaktion zu erwecken. Hingegen gab 5 bis 15 Minuten auf 75°, desgleichen auf 80° und höher erhitzte Milch die Zonenprobe nicht mehr; ebenso erzielten hier spätere Wiederholungen der Prüfung ständig nur negative Ergebnisse.

Gemische aus genügend erhitzter, oder aufgekochter und 20 % roher Milch waren mit Guajakholztinkturen in 5 Minuten durchweg sicher zu erweisen, wogegen hier bereits eine grössere Anzahl von Harztinkturen wiederholt versagte. Bei 15% Rohmilchzusatz setzten vereinzelt auch die Holztinkturen aus, doch gab mit diesen noch Mischmilch mit 10 % Rohmilchgehalt in etwa ¾ der geprüften Fälle nach längerer Beobachtung (20 Minuten) die blaue Zone. Rohmilchbeimischungen von 9 % abwärts erwies das Guajakschichtverfahren sehr unsicher; auch waren hier die vereinzelt entstandenen Zonen recht matt und, da sie nur ¼ bis ½ mm breit wurden und gewöhnlich schnell verblassten, schwieriger zu erkennen. Immerhin liessen bisweilen, bei anscheinend für die Guajakprobe besonders günstiger Milch und ausgedehnter Kontrolle, selbst Gemische mit 5%, in einem Falle sogar mit nur 4 % roher Milch die Ringfärbung deutlich bemerken. Derartige Fälle bildeten indes stets nur die Ausnahme von der Regel, nach welcher der Nachweis von weniger als 20 % roher in stark erhitzter Milch, auch bei Verwendung einwandsfrei gebrauchsfähiger Holztinkturen, als zweifelhaft bezeichnet werden muss. —

Bei sämtlichen Versuchen mit Vollmilch lieferten die mit Alkohol hergestellten Holztinkturen die gleichmässigsten und durchschnittlich auch die schärfsten Resultate, während sich die Harzauszüge viel unregelmässiger verhielten. Aus diesen Gründen schaltete ich die Harztinkturen bei der Prüfung von Magermilch, Rahm, Buttermilch und Molke aus und gebrauchte hierzu lediglich die Holztinkturen des 70 %igen Alkohols (1 : 5).

2. ad Magermilch und Rahm.

Magermilch und Rahm brachten bei dem Guajakringverfahren die gleichen Erscheinungen wie Vollmilch hervor.

3. ad Buttermilch.

Auf 70° erhitzte Buttermilch verhielt sich zuweilen zweifelhaft und vermochte dann auch bei später wiederholten Versuchen die Reaktion nur vereinzelt oder verschwommen zu erwecken. Noch unsicherer zeigte sich kurze Zeit auf 71 bis 74° erwärmte Buttermilch. Durch gleichmässiges Pasteurisieren auf 75°, 80° etc. schwand ihr Reaktionsvermögen gänzlich.

Negative Ergebnisse lieferte ferner solche Buttermilch, welche von einem Rahm stammte, der durch das Pasteurisieren seine Wirksamkeit verloren hatte.

4. ad Molke.

Rohe Molke, welche in der Regel durch freiwilliges Gerinnen, teilweise aber auch durch Zusatz von Essigsäure aus Voll- resp. Magermilch hergestellt wurde, gab, wie zuvor die frische Milch, stets kräftige Zonenfärbungen. Desgleichen erzeugte die Molke von jeder nicht bis zum völligen Verschwinden der Reaktionsfähigkeit erhitzten, z. B. von längere Zeit auf 70° oder soeben auf 75° pasteurisierter Milch in 2 bis 5 Minuten die Ringprobe entsprechend deutlich. Für sich erwärmte Molke verlor dagegen die Fähigkeit der Guajakbläuung schon bei 70° vollständig.

Molke von Mischmilch mit 30 bis 20 % Rohmilchgehalt, ebenso entsprechende Gemische von genügend erhitzter und roher Molke, konnten deutlich und zuverlässig in spätestens 10 Minuten nachgewiesen werden. Geringere Zusätze an rohem Material (namentlich weniger als 10 %) waren unsicherer resp. nur vereinzelt zu erkennen. —

Bei obigen Versuchen hatte also selbst starke Säuerung auf das Erscheinen der Zonenreaktion keinen merklichen Einfluss. Zusätze von Alkalien (Kalkwasser), ohne welche z. B. die Storch'sche oder die Utz'sche Reaktion in saurer Milch oder in Molke nicht zustande kommt, wurden daher bei der Guajakringprobe überflüssig. —

Wie ferner bereits angedeutet worden ist, riefen zweifelhafte Proben von pasteurisierter Milch oder von Mischmilch bisweilen nach längerer Aufhebung die Reaktion hervor. Wenn aber eine derartige Milch nicht bereits nach 12 bis 24 Stunden Spuren von Reaktionsfähigkeit erkennen liess, vermochte sie auch in noch höherem Alter die Reaktion nicht zu erwecken. Als geeignet erwies sich ausserdem nur die offene Aufstellung, da, wie wiederholt festgestellt werden konnte, in den vorhin[1]) erwähnten sterilen, verschlossenen Gefässen die sehr bald eintretende Fäulnis schon bei wirksam gewordener Milch das geringe Reaktionsvermögen wieder unterdrückte.

Versuche mit der Guajakringprobe unter Verwendung von Wasserstoffsuperoxyd.

Wasserstoffsuperoxyd wurde nur ausnahmsweise zu Vergleichszwecken und hauptsächlich dort verwandt, wo der Eintritt der Reaktion auf Guajaktinktur allein ungewiss erschien. Zu den Versuchen dienten meist eine 0,2 %ige, seltener eine 1 %ige und nur vereinzelt stärkere Konzentrationen. Zunächst bestätigte sich die von Zink u. a. gemachte Erfahrung, dass bei roher Milch und jungen, noch nicht wirksam gewordenen Tinkturen der Zusatz eines resp. weniger Tropfen Wasserstoffsuperoxyd die sonst ausbleibende Farbenerscheinung einleitet. Indessen zeigten die mit 15 bis 20 Tropfen ganz frischer Tinktur und Wasserstoffsuperoxyd hervorgerufenen Reaktionen dieselben Eigenschaften wie bei Anwendung von Guajakauszügen in den Anfängen der Autooxydation. Sie äusserten sich meist sehr schwach durch grüne bis blaugrüne Flecke an der Oberfläche oder im Innern des braunen Mischringes und bildeten sich erst mit zunehmendem Alter der Tinkturen all-

[1]) cf. S. 56.

mählich zu Zonen aus. Ferner glückte es auch, mit fast allen als untauglich erwiesenen Guajaktinkturen nach Zugabe von Wasserstoffsuperoxyd derartige mehr oder minder vollkommene Reaktionen zu erhalten. Eine ganz alte, fertig erstandene Harztinktur versagte hingegen in jedem Falle, auch bei Anwendung von selbst 5 bis 6 Tropfen 0,2 — wie 1%igen und stärkeren Wasserstoffsuperoxydes, obwohl die Versuche mit den verschiedensten Rohmilchproben wiederholt und 1 Stunde lang beobachtet wurden. Dasselbe negative Resultat zeitigten auch zwei selbst hergestellte, nicht reaktionsfähig gewordene Harztinkturen in vorgerücktem Alter, sodass die Wasserstoffsuperoxyd - Guajakschichtprobe mit unbrauchbaren und namentlich alten Tinkturen doch als eine recht mangelhafte anzusehen ist.

Nach längerem Erhitzen der Milch auf 75° und höhere Temperaturen trat auch mit gebrauchsfähiger Tinktur und Wasserstoffsuperoxyd nie die Reaktion ein.

Bei Mischmilch mit geringem Rohmilchgehalt (5 bis 10 %) brachte das Zuträufeln von Wasserstoffsuperoxyd unsicher eingetretene Reaktionen öfters zur Deutlichkeit, gänzlich ausbleibende dagegen nur selten zum Erscheinen. Denn es rief eine grössere Zahl verschiedenster Mischmilchproben, darunter sogar solche mit 15 und 10 % roher Milch, bei welchen einwandsfrei gebrauchsfähige Guajaktinkturen gänzlich versagten, in Wiederholung der Versuche unter Wasserstoffsuperoxydzusatz innerhalb 30 Minuten und längerer Kontrolle ebenfalls nicht die geringste Spur von Blaufärbung hervor. Andere Tinkturen hingegen gaben mit den nämlichen Milchproben allein eine genügend starke Zone, wie auch manche in solchen Fällen aussetzenden Guajakauszüge bei einer anderen, entsprechend zusammengesetzten Mischmilch die Ringreaktion ohne Wasserstoffsuperoxyd sehr deutlich erzeugten.

Auch vermochte die Beigabe von Wasserstoffsuperoxyd zu pasteurisierter oder Mischmilch, welche ihre geringere Reaktionsfähigkeit infolge beginnender Fäulnis verloren hatte, die Reaktion niemals von neuem zu erwecken.

Die Erkennung erwähnter mangelhafter Zustände der Milch ist also bisweilen schon mit einwandsfreier Tinktur und Wasserstoffsuperoxyd nicht möglich. Noch viel weniger wird aber derartige Milch mit jungen, noch garnicht reaktionsfähigen, resp. alten unbrauchbaren Guajakauszügen nachgewiesen werden können, bei welchen das Wasserstoffsuperoxyd doch zunächst den zu erwartenden oder bereits verlorenen Oxydationszustand ersetzen soll, wenn ausserdem, nach den Beobachtungen von Weber[1]) und Zink[2]) das Wasserstoffsuperoxyd unter Umständen sogar reaktionsverzögernd wirken kann. Nicht der Zusatz von Wasserstoffsuperoxyd, sondern vielmehr der Reichtum der Milch an dem die Guajakbläuung der Milch hervorrufenden Ferment und der Grad der Wirksamkeit der benutzten Tinktur sind für den Eintritt der Reaktion bei Mischmilch massgebend! —

Somit kann der Verwendung von Wasserstoffsuperoxyd bei der Guajakringprobe keine ausschlaggebende Bedeutung beigemessen

[1]) Weber cf. S. 17.
[2]) Zink cf. S. 23 ff.

werden. Vermag jene auch die fehlende Gebrauchsfähigkeit der Guajakauszüge in gewissem Grade zu ersetzen, so gilt das hauptsächlich bei roher oder sehr mangelhaft erhitzter Milch. Bei Mischmilch hingegen, wo das Oxydationsmittel besonders am Platze wäre, bietet das Wasserstoffsuperoxyd, selbst neben Tinkturen von vollendeter Autooxydation, nur unwesentliche Vorteile. Denn auch hier lässt sich das mit dem Wasserstoffsuperoxyd-Guajakschichtverfahren Erreichbare, z. B. der sehr unsicher glückende Nachweis von 5% Rohmilchzusatz, erwiesenermassen ebenso gut mit einer kräftigen Guajakholztinktur allein zuwege bringen. Ferner wird durch den Gebrauch von Wasserstoffsuperoxyd das Guajakverfahren umständlicher, somit der Wert desselben verringert. Zudem lassen sich bei der Guajakringprobe auftauchende Zweifel, wie unsicherer Eintritt der Reaktion, durch den Besitz mehrerer — etwa 3 zu verschiedenen Zeiten aus jeweils anderem Material angesetzter und bei Abnahme der Brauchbarkeit abwechselnd zu ergänzender — Guajakholztinkturen in Kontrollversuchen leicht beseitigen.

Resumee.

Meine hauptsächlichsten Ergebnisse über die Guajakringprobe lassen sich in folgenden Leitsätzen kurz zusammenfassen:

1. Das Guajakverfahren ist bei Verwendung kräftig reaktionsfähiger Tinkturen zum Nachweise roher wie mangelhaft erhitzter Milch oder Molke, desgleichen bei Gemischen aus den genügend erhitzten und rohen Produkten zweifellos brauchbar. Da die Schichtmethode schärfer, insbesondere aber zuverlässiger ist als die vielfach noch empfohlene Mischreaktion, hat die Milchprüfung nur in Form der Guajakringprobe zu geschehen.

2. Um sich über die Wirksamkeit der zu gebrauchenden Tinktur genaueste Kenntnis zu verschaffen, ist ihre frische Herstellung und zeitweise Prüfung (namentlich mit Mischmilch) bis zur Gebrauchsfähigkeit den fertig in den Handel gebrachten Guajakauszügen vorzuziehen. Auch ist bei den Ansätzen das jüngere und darum einwandsfreiere Material grosser bezw. chemischer Versandgeschäfte zu berücksichtigen.

3. Nur die Guajakholztinkturen geben für lange Zeit gleichmässige und sichere Resultate. Dagegen äussern sich bei den Harzauszügen, infolge des sehr ungleichmässigen Ausgangsmaterials, hinsichtlich der Dauer und der Schärfe der Reaktionsfähigkeit wesentliche Differenzen. Vielfach stehen jene den Holztinkturen an Wirksamkeit in nichts nach; andererseits wieder bleibt eine beträchtliche Menge minderwertiger als diese. Ferner gehen Ansätze aus sehr mangelhaften resp. untauglichen Harzproben, ohne Unterschied des Auszugsmittels, entweder überhaupt nicht in Oxydation, oder sie verlieren das Reaktionsvermögen schon binnen weniger Monate. Zu Versuchszwecken soll daher lediglich garantiert natürliches, d. h. ungereinigtes, und als solches nach Hagers Methode erwiesenes Guajakharz „in massa" verwendet werden.

4. In meist kürzerer Zeit, als der käufliche 94 bis 96%ige Alkohol und das Aceton, bringt der verdünnte, 70%igeAlkohol jegliche mit ihm

hergestellte Holztinktur zur Reaktionsfähigkeit. Die nach der Pharmakopöe im Ansatzverhältnis 1 :5 anzufertigenden Guajakholztinkturen werden an schattigem Orte bei Zimmertemperatur gehalten, häufig durchgeschüttelt, nach 7 bis 10 Tagen dekantiert und auch weiterhin geschützt vor dem Sonnenlichte (der Bequemlichkeit halber in braunen Tropfzählflaschen) aufbewahrt. Derart mit dem 70 %igen Alkohol gewonnene Guajakauszüge erweisen sich in wenigen Tagen bis spätestens 3 Wochen reaktionsfähig und sind nach 30 bis 40 Tagen ohne Bedenken zu gebrauchen. Die Holztinkturen des 94 bis 96 %igen Alkohols geben häufig später, zuweilen erst nach doppelt so langem Stehen, die ersten Zeichen der Autooxydation und sind daher vor 40 bis 50 Tagen nicht anwendbar. Dann stehen sie aber den Holztinkturen des 70 %igen Alkohols an Reaktionsschärfe nicht nach, sind gleichfalls von durchsichtiger braunroter Färbung und wie letztere über Jahresfrist noch unverändert wirksam.

Das Aceton vermag nicht jede, im Alkoholauszug taugliche, Holzprobe in Autooxydation zu bringen.

Bei seltenem Gebrauch sind die Tinkturen von Zeit zu Zeit mit roher sowie Mischmilch auf ihre Wirksamkeit zu prüfen.

5. Vorbedingung einer kräftigen Reaktion ist ein nicht zu gering bemessener Tinkturzusatz, desgleichen nicht übertriebene Sparsamkeit an Milch. Bei Anwendung von 10 bis 12 Tropfen Guajakholztinktur auf ca. 10 ccm Milch tritt bei jeder der Guajakreaktion überhaupt fähigen Milch die blaue Zone genügend deutlich ein, wobei schwaches Bewegen des Reagensglases das Entstehen der Reaktion unterstützt. Milchproben, welche binnen weniger Minuten die Ringfärbung nicht erzeugen, müssen mindestens ½ Stunde lang beobachtet werden, weil bei ihnen noch immer der Verdacht auf Mischmilch vorliegt.

6. Rohe oder mässig erhitzte Vollmilch, ebenso derartige Proben von Magermilch, Rahm, Buttermilch und Molke lassen die Zonenreaktion innerhalb weniger Sekunden bis 1 Minute, selten erst später, zuverlässig erkennen. Werden die Produkte bis nahe zur Grenze ihres Reaktionsvermögens pasteurisiert, so erscheint die Blaufärbung mit längstens 3 bis 5 Minuten.

Selbst starke Säuerung verhindert die Guajakreaktion nicht. Aus diesem Grunde kann man bei sehr verdickter Milch die Molke davon zur Prüfung verwenden. Denn jede ungenügende Erhitzung der Milch, selbst bis an die für das Ausbleiben der Reaktion kritische Temperatur, lässt sich in der Molke binnen wenigen Minuten deutlich nachweisen.

7. Die Reaktion tritt bei Vollmilch, Magermilch, Rahm und Buttermilch nicht mehr ein, wenn diese längere Zeit (5 Minuten und mehr) auf 75° oder höhere Temperaturen erhitzt worden sind. Für sich erwärmte Molke versagt dagegen schon nach kurzfristigem Pasteurisieren auf 70°.

8. Mischmilch mit 50 % resp. noch stärkerem Rohmilchgehalt verhält sich bei der Guajakringprobe wie unerwärmte Milch. 40 bis 30% roher in genügend erhitzter Milch sind in 3 Minuten, 25 bis 20% in spätestens 5 Minuten mit Guajakholztinktur nachweisbar. Innerhalb ca. 15 Minuten lassen sich auch Rohmilchzusätze von 15%, sowohl in der frischen Mischmilch wie in der Molke davon, noch ziemlich sicher

ermitteln, solche von 10 % hingegen in beiden Fällen seltener und schwächer bei etwa 20 Minuten langer Kontrolle. Noch geringere Rohmilchbeimengungen sind nur vereinzelt und in der Regel sehr undeutlich zu erkennen. —

Das Gleiche gilt für Gemische aus genügend erhitzter und roher Molke in entsprechenden Verhältnissen.

9. Durch die Verwendung von Wasserstoffsuperoxyd wird die Guajakmethode, welche für den Laien das einfachste und wegen der Haltbarkeit des Reagenzes bequemste Verfahren ist, umständlicher. Als wesentlichster Vorteil der Wasserstoffsuperoxyd-Guajakringprobe ist anzuführen, dass sie die Reaktion auch mit jungen, noch nicht oxydierten Tinkturen in Rohmilch zu erzwingen vermag. Indessen sind die hervorgerufenen Färbungen nur schwach resp. die Ringform mangelhaft, und deshalb frische Guajakansätze zur Erkennung von Mischmilch oder in stärkerem Masse pasteurisierter Milch untauglich. Ferner gibt nicht jede alte unbrauchbare Tinktur auf Wasserstoffsuperoxydzusatz die Reaktion. Zudem lässt sich das überhaupt Erreichbare, z. B. der auch beim Zuträufeln von Wasserstoffsuperoxyd unsicher bleibende Nachweis von 10 % und weniger roher in genügend hoch erhitzter Milch, ebenso gut mit einer kräftigen Guajakholztinktur allein zustande bringen. Wer schon zum Wasserstoffsuperoxyd greifen will, sollte sich daher zweckmässig einem der bei Mischmilch schärferen Verfahren, wie der Paraphenylendiamin- oder der Ursolreaktion zuwenden.

2. Das Guajakverfahren nach Carcano.

Wie Carcano es vorschreibt,[1]) wurde ein wenig Milch im Porzellanschälchen mit einigen Tropfen Terpentinöl versetzt, schwach erwärmt und etwas Guajaktinktur hinzugefügt. Ferner geschah die Ausführung der Probe in Form von Parallelversuchen zwischen dem aetherischen gereinigten und dem im Handel käuflichen Terpentinöl. Nach der zu Gebote stehenden Literatur scheint Carcano keine näheren Angaben über die Beschaffenheit der zu verwendenden Guajaktinktur gemacht zu haben. Zink[2]) andererseits erzielte bei der Zonenprobe mit nicht reaktionsfähigen Guajakauszügen nach Zusatz 1 Tropfens Terpentinöl in Rohmilch eine schöne lange anhaltende Blaufärbung, somit eine dem Wasserstoffsuperoxyd entsprechende, die Reaktionsfähigkeit der Tinktur entbehrlich machende Wirkung des Terpentinöls.

Zur Nachprüfung dieser Angaben benutzte ich teils ganz unbrauchbare teils noch nicht autooxydierte Guajakharz- wie Holztinkturen. Daneben diente eine gebrauchsfertige Guajakholztinktur in Alkohol zum Vergleich.

Bei Rohmilch trat mit jeder Tinktur die Reaktion als eine blaue, fleckig blaue oder fleckig blaugrüne Decke an der Oberfläche der Milch auf. Indes stand jene an Intensität und Vollkommenheit der Guajakringreaktion bei weitem nach. Fernerhin bildeten sich leider auch bei gekochter Milch in vielen Fällen, und fast durchweg mit den Harztink-

[1]) S. 14.
[2]) S. 24.

turen, vereinzelt mehr oder minder grosse blaue Flecke. Wie sofort angestellte Versuche zeigten, gaben derartige Tinkturen schon mit Terpentinöl allein eine stark blaue Reaktion.

Gereinigtes und käufliches Terpentinöl liessen in ihrer Wirksamkeit keine Unterschiede erkennen.

Hinsichtlich der ungünstigen Ergebnisse, und weil

a. nach Schaer[1]) auch das Terpentinöl unter Einwirkung von Licht und Luft Ozon bilden und damit direkt Guajak bläuende Eigenschaft annehmen kann, ferner

b. Auszüge aus mangelhaftem Guajakharz bei der Hager'schen Probe durch Terpentinöl an sich stark gebläut werden, kann jedoch dem Carcano'schen Verfahren bei gekochter Milch keine Zuverlässigkeit beigemessen werden.

3. Die Methode Storch.

Zur Ausführung der Storch'schen Reaktion benutzte ich die von dem Autor erprobten[2]) und zur Zeit in Dänemark gebräuchlichen Reagentien: eine 2 %ige wässerige Paraphenylendiaminlösung[3]) nebst 0,2 %igem Wasserstoffsuperoxyd. Letzteres wie auch alle jene Wasserstoffsuperoxydlösungen, welche bei der Prüfung der anderen Verfahren verwendet wurden, stellte ich aus 30 gewichts- (= 100 volumen-) prozentigem Wasserstoffsuperoxyd durch Verdünnen mit destilliertem Wasser her und hielt dieselben bei Nichtbenutzung vollkommen im Dunkeln. Auf diese Weise zeigte sich das Storch'sche Wasserstoffsuperoxyd gegen Kaliumbichromat noch nach 7 Monaten deutlich wirksam. Die Paraphenylendiaminlösung, welche vorschriftsmässig in brauner Tropfzählflasche an kühlem, schattigem Orte aufbewahrt wurde, blieb in einigen Fällen bis gegen 3 Monate reaktionsfähig. Jedoch war dieselbe über 1½, höchstens 2 Monate hinaus nicht gut zu verwenden, da durch ihre fortschreitende Zersetzung einerseits die Reinheit, Schärfe und Schnelligkeit der Rohmilchreaktion entsprechend beeinflusst wurde, und andererseits die starken Verfärbungen bei der gekochten Milch den Unterschied der Reaktion zu sehr verwischten.

Die vorschriftsmässig (durch Umschütteln mit 2 Tropfen Paraphenylendiaminlösung und 1 Tropfen Wasserstoffsuperoxyd) mit ca. 5 ccm Milch ausgeführte Prüfung ergab durchweg zuverlässige Resultate schon bei roher und aufgekochter Vollmilch, ebenso aber bei Magermilch, Rahm, Buttermilch und Molke.

Die charakteristische Blaufärbung erfolgte in 50 verschiedenen Proben roher Vollmilch prompt und scharf in wenigen Sekunden, und wurde auch durch starke Wasserzusätze (von 50 bis 90%) in keiner Weise gestört. Im Gegenteil fiel das Blau innerhalb gewisser Grenzen um so intensiver aus, je stärker die Milch mit Wasser verdünnt wurde. Gekochte Vollmilch (etwa 25 verschiedene Proben) blieb bei Verwendung frischer oder mässig alter Lösung rein weiss. Nach längerem Stehen der Proben an Licht und Luft (ungefähr mit 15 bis 30 Mi-

[1]) S. 21.
[2]) vergl. S. 26 und 32.
[3]) Para-Phenylendiamin Purum Cryst. von E. Merck-Darmstadt.

Tabellen zur Methode Storch.

(G bis K).



nuten, bisweilen auch früher oder noch später) bildeten sich freilich auch in stark erhitzter Milch matte, weissbläuliche bis violettrötliche Verfärbungen. Da diese aber in der ersten halben Stunde an Intensität keine merklichen Fortschritte erfuhren, vielmehr in der Regel erst nach mehreren Stunden stark blau wurden, waren sie mit der Reaktion in keiner Weise zu verwechseln. Säuerung der Milch wirkte auf diese Verfärbungserscheinungen hemmend und bei hohem Alter der Milch gänzlich verhindernd ein.

Stark pasteurisierte Milch, welche nicht schon binnen weniger Minuten den Beginn der Reaktion zeigte, vermochte wie die gekochte und sterilisierte Milch auch nach längerer Aufbewahrung, ganz gleich ob in offenen oder in sterilen geschlossenen Gefässen, die Blaufärbung nicht zu erwecken.

Die Resultate der weiterhin mit den verschiedensten Arten von Vollmilch, sowie Magermilch, Rahm, Buttermilch und Molke angestellten Versuche, ebenso die Schärfe des Verfahrens ergeben sich aus den Tabellen G bis K.

Mit deren Hilfe lassen sich über das Storch'sche Verfahren für die Praxis folgende Leitsätze aufstellen:

1. Die Storch'sche Methode lässt jede rohe oder mangelhaft erhitzte Vollmilch, Magermilch, Rahm, Buttermilch und Molke sicher und scharf erkennen. Desgleichen ist das Verfahren bei Gemischen zuverlässig und vermag selbst Zusätze von 2 % roher zur stark erhitzten Milch oder Molke deutlich zu erweisen.

Die Farbe der Reaktion ist bei Vollmilch, Magermilch, Rahm und Buttermilch blau bis blaugrau, bei der Molke violett. Jedoch gibt sehr saure Buttermilch, wenn sie stark aber noch nicht genügend pasteurisiert worden ist, bisweilen ebenfalls eine violette Färbung.

2. Ueberhand nehmende Säuerung der Milch vermindert die Intensität und die Schnelligkeit der Reaktion bis zum völligen Ausbleiben der letzteren (etwa bei 3 Tage alter Milch). Sehr saure Vollmilch, Magermilch, Rahm und Buttermilch sind demnach von hinlänglich erhitzten Proben in saurem Zustande nicht mehr zu unterscheiden. Wird aber die Säure gebunden, so stellen sich die normalen Verhältnisse wieder her. Zur Vermeidung von Trugschlüssen ist es daher zweckmässig, jede in Säuerung übergegangene Milch bei der Untersuchung im ½ bis 1 Volumen der Reaktionsprobe mit Kalkwasser zu neutralisieren oder schwach alkalisch zu machen. Unerlässlich ist dieses bei der stets sauren Molke, zumal diese durch nicht ganz frische Paraphenylendiaminlösung an sich eine leicht täuschende rotbraune Farbe erhält.

3. Die Reaktion erscheint bei jeder rohen oder nur mässig erhitzten frischen oder neutralisierten Vollmilch, Magermilch, Rahm, Buttermilch und Molke binnen wenigen Sekunden bis spätestens ½ Minute in voller Intensität. Bei den bis nahe zur Grenze der Reaktionsfähigkeit erhitzten Proben (vergl. Punkt 4.), sowie bei den Gemischen aus stark erhitzter Milch oder Molke mit 5 bis 2 % des rohen Materials erfolgt sie deutlich in längstens 5 Minuten. Letztere Frist ist bei der Storch'schen Probe als Norm der Beobachtungsdauer anzusehen.

4. Die Reaktion kommt bei Vollmilch, Magermilch und Rahm nicht mehr zustande, wenn diese gleichmässig auf 80° erwärmt worden sind.

Buttermilch versagt die charakteristische Färbung schon, sobald sie gleichmässig auf 75° pasteurisiert worden ist.

Aus Rohmilch gewonnene Molke verliert das Reaktionsvermögen durch längeres Erhitzen bei 70°. Im Gegensatze dazu färbt sich aber eine Molke noch deutlich violett, wenn sie von einer Milch stammt, die zwar auf höhere Temperaturen (z. B. auf 75 oder 78°) pasteurisiert, aber noch reaktionsfähig war.

Bei derPrüfung der Storch'schen Methode wurden auch einige vergleichende Versuche mit 1%igem Wasserstoffsuperoxyd angestellt. Die Reaktion der Rohmilch fiel hierbei schärfer, nämlich indigoblau aus. Ebenso gaben die Zusätze von 5 bis 2 % roher zur stark erhitzten Milch eine etwas stärkere Blaufärbung. Gekochte Milch zeigte nach längerem Stehen gleichfalls die vorhin erwähnte Verfärbung. Die Molke verhielt sich entsprechend der zu ihrer Herstellung verwendeten Milch.

Wesentliche Vorzüge hätte somit diese Modifikation der Storchschen Probe nicht.

4. Das Storch'sche Verfahren in der Abänderung von Schaffer.

Schaffer will die Storch'sche Probe mit der gleichen Menge der Reagentien, aber bei 10 ccm Milch ausgeführt wissen,[1]) während Storch[2]) 1 Teelöffel, d. h. etwa 3 ccm Milch als genügend erachtete. Der Unterschied beider Verfahren liegt somit lediglich in der Verwendung des dreifachen Milchquantums bei der Schaffer'schen Paraphenylendiaminreaktion. Letztere wurde bei sämtlichen Vollmilchproben mit der Storch'schen Methode in Parallelversuchen verglichen.

Das Verfahren erwies sich bei Rohmilch, ungenügend erhitzter Milch, Gemischen aus stark erhitzter mit 5 bis 2 % roher und desgleichen bei verwässerter Milch der Hauptsache nach wie das Storchsche brauchbar. Längere Zeit auf 80° oder darüber erhitzte Milch gab die Reaktion nicht.

Vorzüge der Schaffer'schen Probe vor der Storch'schen waren nicht zu ermitteln, dagegen folgende Mängel:

1. Bei allen eingetretenen Reaktionen war die Färbung etwas weniger intensiv als bei der Storch'schen Methode.

2. Der Eintritt der Reaktion erfolgte bei normaler Rohmilch um einige Sekunden später und kam in der Regel erst mit etwa ½ Minute auf die Maximalfärbung. Bei nahe an die Grenze der Reaktionsfähigkeit pasteurisierter Milch, oder bei Mischmilch mit 5 bis 2 % Rohmilchgehalt, differierte das Erscheinen der Reaktion und ihre Maximalfärbung von den nach Storch untersuchten Proben noch mehr. Trat z. B. in solchen weniger günstigen Fällen (vergl. Tabelle G. z. Bsp.) bei

---

[1]) Schaffer cf. S. 29.
[2]) Storch cf. S. 26.

Anwendung der Methode Storch die Blaufärbung in 5 Minuten ein, so erfolgte sie nach Schaffer erst in 7 bis 8 Minuten.

Hiernach muss für die Schaffer'sche Probe die Beobachtungszeit auf 10 Minuten ausgedehnt werden.

3. Säuernde Milch hatte in dem von Schaffer vorgeschriebenen Reaktionsquantum einen entsprechend stärkeren Einfluss auf die Wirksamkeit der Reagentien und liess etwa entstandene Färbungen um so früher verblassen. Auch wurde bei Zusatz des halben oder gleichen Volumens Kalkwasser zu den erforderlichen 10 ccm saurer Milch die Flüssigkeitsmenge für die wenigen Tropfen der Reagentien zu gross, und dadurch die Intensität der Reaktion abgeschwächt.

Hingegen machte sich bei der Schaffer'schen Modifikation die Verfärbung der gekochten Milch etwas später bemerkbar als in den nach Storch behandelten Proben.

Aus obigen Nachteilen wurde bei der weiteren Milchprüfung der Schaffer'sche modus nicht mehr berücksichtigt.

5. Die Ursolprobe von Utz.

In Teil I, 3.[1]) ist dieses Verfahren nach Utz bereits hinreichend besprochen worden.

Zur Ausführung benutzte ich einmal die von Utz vorgeschriebene Ursol D-lösung 0,1 : 30 in absolutem Alkohol und dann auch Ursol D[2]) in fester Form, und zwar wurden einige Tropfen der Lösung resp. wenige Blättchen des festen Ursols (3 bis 5) mit ca. 5 ccm Milch durch Umschütteln vermischt.

Die blaugefärbte Reaktion soll bei roher oder ungenügend erhitzter, sowie auch bei Mischmilch auf Zusatz einiger Tropfen (0,5 ccm) einer ca 1%igen Wasserstoffsuperoxydlösung eintreten. Die Schnelligkeit des Reaktionseintrittes verlangsamt sich um so mehr, je stärker die Milch erhitzt worden ist, oder je weniger Rohmilch eine Mischmilch enthält. Statt Wasserstoffsuperoxydlösung rät Utz Ammoniumpersulfat oder auch Kaliumperkarbonat in fester Form anzuwenden. Er empfiehlt ferner den Gebrauch von Tabletten, welche aus vorstehenden Ingredienzien mit einem indifferenten Bindemittel hergestellt sind. Desgleichen erwähnt Utz der Ursoltabletten, auf deren Anwendung er besonderes Gewicht legt, ohne jedoch anzugeben, in wie grosser Menge das eine oder das andere Agens in einer Tablette enthalten sein soll, obgleich er von genauestens bestimmten Mengenverhältnissen spricht.

Bei meinen Versuchen habe ich Ammoniumpersulfat[3]) sowohl in fester Form wie in Lösung zugesetzt, während Kaliumperkarbonat[4]) nur als Substanz in Gebrauch genommen wurde. Festes Ammoniumpersulfat gab in den kleinsten Mengen (Körnchen) stets eine Blaureaktion mit Ursol D schon auf Wasserzusatz, desgleichen beim Mischen mit gekochter Milch in kurzer Zeit (2 bis 3 Minuten), während diese Reaktionen bei Benutzung von Kaliumperkarbonat nie zu beobachten

---

[1]) S. 33 ff.
[2]) Aktiengesellschaft für Anilinfabrikation-Berlin.
[3]) Ammonium Persulfuricum v. E. Merck-Darmstadt.
[4]) Kalium Percarbonicum purum v. E. Merck-Darmstadt.

waren. Um die Dosierung von Ammoniumpersulfat noch winziger zu gestalten, wurden frisch bereitete Lösungen verwendet, doch traten auch jetzt ständig Blaufärbungen in stark erhitzter Milch ein. Diese waren wohl nicht immer so intensiv wie auf Zusatz von roher Milch, da sie von der Menge des zugegebenen Persulfates abhängig waren; immerhin zeigten sie sich auch bei den geringsten Gaben zwar schwach, jedoch deutlich. Zudem hatte das Persulfat selbst bei vorsichtigster Aufbewahrung nur eine relative Haltbarkeit, insofern eine geringe Quantität des Salzes im Trockengläschen bei nicht allzuhäufiger Entnahme eines Körnchens bald zu einer festen Masse verschmolz. Die bei ungefähr 50 verschiedenen Vollmilchproben ausgeführten Versuche hatten sämtlich ein negatives Ergebnis, sodass die Probe mit Ammoniumpersulfat zum mindesten als unsicher bezeichnet werden muss, und ich lasse es dahingestellt, welche Ursachen diese Misserfolge gezeitigt haben.

Günstige Resultate gab hingegen die Ursol D-lösung einmal mit Wasserstoffsuperoxyd (Utz) und ferner mit festem Kaliumperkarbonat. Bei Anwendung frisch bereiteter resp. bis 2 Wochen alter Ursol D-lösung trat hier die Reaktion in der frischen Milch durchweg scharf und prompt ein.

Da jedoch die Ursol D-lösung auf Grund meiner zahlreichen Versuche gleichfalls eine recht geringe Haltbarkeit (2 bis 3 Wochen) besitzt, und da ferner auch der Wasserstoffsuperoxydlösung nur eine gewisse Brauchbarkeitsdauer zukommt, liess ich nur noch die alleinige Verwendung von festem Ursol und festem Kaliumperkarbonat (1 bis 2 Körnchen) gelten. Mit diesen Agentien — Ursol D und Kaliumperkarbonat — erhielt ich Resultate, die ebenso wie das Storch'sche Verfahren noch den geringen Zusatz von 2 % roher zur stark erhitzten Milch in 5 Minuten sicher erkennen liessen. In den Tabellen L bis O gebe ich eine Uebersicht über meine in diesem Abschnitt kurz skizzierten Versuche.

Wie die Tabellen lehren, erwies sich die Probe mit der Ursollösung bei Molke von Mischmilch mit weniger als 5% Rohmilchgehalt nicht mehr scharf genug, ebensowenig bei entsprechenden Gemischen von stark erhitzter und roher Molke. Wohl aber waren diese Reaktionen mit Ursol D in Substanz und festem Kaliumperkarbonat noch deutlich und sicher zu erbringen. Auch vollzog sich die Ursolreaktion durchschnittlich etwas langsamer als die Storch'sche, was wiederum besonders bei der Molke der auf höhere Temperaturen (75°, 79°) erhitzten, aber noch reaktionsfähigen Milch, ferner bei der Mischmolke zu beobachten war. Nach den vermerkten Zahlen ist als äusserste Zeitgrenze für den Reaktionseintritt eine 10 Minuten lange Kontrolle einzuhalten.

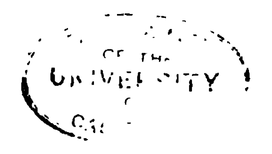
Im übrigen sind die bei der Storch'schen Probe gemachten Erfahrungen und aufgestellten Grundsätze der Hauptsache nach auch für die Ursolprobe zutreffend, zumal nach den Angaben der Aktiengesellschaft für Anilinfabrikation und den Befunden von Utz[1]) unter Ursol D nicht gereinigtes, zu technischen Zwecken hergestelltes Parapheny-

[1]) S. 36 ff.

Tabellen zur Ursolprobe.

(L bis O).


LIBRARY
OF THE
UNIVERSITY
OF
CALIF



lendiamin zu verstehen ist. Demgemäss zeigen sich natürlich auch bei dem Ursolverfahren in stark erhitzter Milch nach längerem Stehen (mit ca. 15 bis 30 Minuten) matt bläulich schimmernde Verfärbungen, welche ebenso wie bei der Paraphenylendiaminprobe zu Täuschungen nicht die geringste Gefahr bieten.

Nach allem ist die Ursolprobe der Storch'schen als vollkommen gleichwertig zur Seite zu stellen. Gegenüber letzterer gewinnt die Modifikation mit festem Ursol D und Kaliumperkarbonat sogar noch durch die grössere Haltbarkeit der Reagentien, welche sich bei geeigneter Aufbewahrung unbegrenzt verwenden lassen. 100 g Ursol D kosten 4,50 M., 100 g Kaliumperkarbonat 2,00 M. Die Reagentien sind also bei ihrer Schärfe angemessen billig, und man kommt, wenn die Versuche sich nicht zu umfangreich gestalten, mit je 10 g Ursol D und Kaliumperkarbonat für 1 Jahr bequem aus.

6. Die Richmond'sche Metaphenylendiaminreaktion.

Das Metaphenylendiamin[1]) prüfte ich zunächst wie das Storch'sche Reagens in 2 %iger, dann aber, da sich diese zu schwach erwies, in 5 %iger wässeriger Lösung. Von beiden Konzentrationen wurden 4—5 Tropfen nebst 1 Tropfen Wasserstoffsuperoxyd (1 %) mit etwa 5 ccm Milch vermischt. Hierbei gaben ca. 40 verschiedene Rohmilchproben sämtlich eine deutliche Reaktion. Letztere war bei Benutzung der 2 %igen Lösung erst mit ungefähr 2 bis 3 Minuten zu erkennen und von matt-hellblauer, der Storch'schen Reaktion ganz erheblich nachstehender Färbung. Die 5 %ige Metaphenylendiaminlösung rief in spätestens ½ Minute kräftige, mehr blauviolette Farben hervor; aber auch diese kamen an Intensität den mit Paraphenylendiamin erzeugten nicht gleich.

Ferner fanden die Richmond'schen Beobachtungen mit Amylalkohol (vergl. S. 39) teilweise ihre Bestätigung. Denn die Metaphenylendiaminreaktion liess sich mit Amylalkohol ausschütteln und blieb hierbei beständig, wogegen das Blau der Storch'schen Probe auf Amylalkoholzusatz zwar in Braun umschlug, aber in jenem nicht gelöst werden konnte. Indessen kann ich ebenso wie Siegfeld in dem Ausschütteln der Reaktionen mit Amylalkohol für die Praxis keinen Wert erblicken.

Das Verfahren erwies sich ferner bei verwässerter, desgleichen bei pasteurisierter Milch und bei Mischmilch brauchbar. (vergl. Tabelle P.)

Gleichmässig auf 80° erhitzte, sowie gekochte und sterilisierte Milch zeigten innerhalb ½ Stunde mit frischer Lösung keine Farbenänderung.

Saure rohe, desgleichen ungenügend erhitzte Milch gab nur matte Reaktionen resp. diese erst nach entsprechenden Zusätzen von Kalkwasser.

Nach den in tabellarischer Uebersicht zusammengefassten Resultaten ist das Richmond'sche Verfahren zweifellos brauchbar. Vorbe-

---

[1]) Phenylendiamin, Salzsaures (Meta-) v. E. de Haën. Chem. Fabrik List (Hannover).

dingung für eine kräftige Reaktion ist jedoch der Gebrauch einer nicht zu gering konzentrierten (wenigstens 5%igen) Metaphenylendiaminlösung. Letztere hält sich in brauner Tropfzählflasche ebensolange wie die Storch'sche. An Empfindlichkeit (namentlich bei Mischmilch) und Intensität der Reaktion sind jedoch das Storch'sche und Utz'sche Verfahren der Metaphenylendiaminprobe überlegen und darum dieser vorzuziehen.

Tabelle P: Versuche mit dem Richmond'schen Verfahren.

Bei der Probe gemischt	Rohe Vollmilch					Gekocht. Vollmilch		Sterilisierte Vollmilch
	Normal	Mit % Wasser versetzt				Normal (ca. 25 Proben)	mit 50% Wasser verdünnt	
		20%	50%	70%	90%			
ca. 5 ccm Milch + 4 bis 5 Tropfen Metaphenylendiaminlösung (5%) + 1 Tropf. Wasserstoffsuperoxyd (1%)	kräftig blauviolett, 1/2 Min.	kräftig blauviolett, 1/2 bis 1 Min.				negativ		negativ

Tabelle Q: Versuche mit Dimethylparaphenylendiamin.

Anstellung der Probe	Rohe Vollmilch					Gekocht. Vollmilch		Sterilisierte Vollmilch
	Normal (ca. 50 Proben)	mit % Wasser versetzt				Normal (ca. 25 Proben)	mit 50% Wasser versetzt	
		20%	50%	70%	90%			
ca. 5 ccm Milch + 2 Tr. Dimethylparaphenylendiaminlösung (2%) + 1 Tr. Wasserstoffsuperoxyd (1%)	kräftig karmoisinrot, sofort	kräftig karmoisinrot, sofort				negativ		negativ

7. Die Storch'sche Reaktion mit Dimethylparaphenylendiamin.

Von dem Dimethylparaphenylendiamin[1]) genügten 2 Tropfen einer 2%igen wässerigen Lösung nebst 1 Tropfen Wasserstoffsuperoxyd (1 %), um jede den Anforderungen des Erhitzens nicht genügende Milch scharf zu erweisen. Rohe Milch erzeugte im Moment eine prachtvoll hell-karmoisinrote Färbung, welche sich schnell zu einem tiefen Rot verdunkelte und nach etwa 10 bis 15 Minuten in ein starkes Violettblau umgeschlagen war.

[1]) Dimethylparaphenylendiaminbase von E. Merck-Darmstadt.

Wasserzusätze, selbst solche von 90 %, störten die Reaktion in keiner Weise.

Gleichmässig auf 80° pasteurisierte, sowie gekochte und sterilisierte Milch gab dieselbe nicht mehr. Mit ca 15 bis 20 Minuten machte sich in der stark erhitzten Milch ein bläulicher Schimmer bemerkbar, welcher aber erst in 1 Stunde oder noch später stark blau wurde. Zudem zeigte sich weder vor noch nach seinem Auftritt auch nicht die geringste

Tabelle P.

Vollmilch, pasteurisiert					Mischmilch mit Rohmilchgehalt in %						
auf 70°	eben auf 75°	15 Min. auf 75°	eben auf 79°	gleichmässig auf 80° und höher	50%	20%	10%	5%	3%	2%	1%
blau-violett, ½ Min.	schwächer blau-violett, 2 bis 3 Min.	matt, aber wenig deutlich, ca. 10 Min.		negativ	kräftig blau violett, 1 Min.	deutlich blau-violett, 3 Min.	matt bläulich-violett, 5 bis 10 Min.	unsicher	negativ		

Tabelle Q.

Vollmilch, pasteurisiert					Mischmilch mit Rohmilchgehalt in %					
auf 70°	eben auf 75°	15 Min. auf 75°	eben auf 79°	gleichmässig auf 80° und höher	20%	10%	5%	3%	2%	1%
kräftig karmoisinrot, sofort	kräftig karmoisinrot schnell	matt karmoisinrot, 3 bis 5 Min.	matt karmoisinrot, 2 bis 3 Min.	negativ	kräftig karmoisinrot, sofort	kräftig karmoisinrot, wenige Sekunden	karmoisinrot, 1 Min.	deutlich karmoisinrot, 2 Min.	matt, aber deutlich karmoisinrot, 3 Min.	karmoisinroter Schimmer, 5 Min.

Spur der für die Reaktion charakteristischen karmoisinroten Färbung, sodass eine Verwechslung stark erhitzter mit roher oder mangelhaft pasteurisierter Milch resp. Mischmilch ausgeschlossen ist.

Gemische von stark erhitzter und nur 2 % roher Milch brachten in wenigen Minuten noch eine schön deutliche Reaktion hervor.

Stark sauer gewordene Milch liess erst nach Zusätzen von Kalkwasser ihre Beschaffenheit sicher erkennen.

Nähere Angaben über den Eintritt und die Intensität der Reaktion, insbesondere für pasteurisierte Milch und Mischmilch, enthält die Tabelle Q.

Wie aus dieser Tabelle hervorgeht, haben wir in der Dimethylparaphenylendiaminlösung ein sehr zuverlässiges und schnell wirkendes Reagens, das wegen der grell hervorstechenden Farbe der Reaktion nur empfohlen werden kann. Auch sind die angeführten Reaktionen sämtlich, wenngleich etwas weniger intensiv, mit 0,2%igem Wasserstoffsuperoxyd zu erhalten. Die Dimethylparaphenylendiaminlösung lässt sich, wenn sie an kühlem Orte vor Licht geschützt aufbewahrt wird, bis 2 Monate verwenden. Leider wird sich das Reagens wegen des hohen Preises von 5,50 Mk. pro 1 dzg Substanz (1 g für 65 Pfg.) in der Praxis nicht einbürgern können.

8. Versuche mit Metadiamidobenzol.

Das Metadiamidobenzol[1]) versuchte ich sowohl in 2%iger wie auch in 5%iger Lösung. Bei Herstellung der ersteren vermochte sich 1 g Substanz in 50 ccm destilliertem Wasser durch schwaches Erwärmen noch zu lösen, hingegen wurde die 5%ige Konzentration mit der erforderlichen Menge eines Gemisches aus Wasser und 25 % Alkohol bereitet. Von beiden Lösungen vermischte ich 4 bis 5 Tropfen nebst 1 Tropfen Wasserstoffsuperoxyd (1 %) mit je 2 bis 3 ccm Milch. Hierbei gab das 2%ige Reagens schon mit roher Milch erst nach 10 bis 15 Minuten eine sehr matte bläulich-graue Färbung, die bei Verwendung von 1 ccm der Lösung etwas deutlicher ausfiel. Mit der 5%igen Konzentration erfolgte die Reaktion in 3 bis 5 Minuten deutlich blaugrau und wurde auch durch stärkere Wasserzusätze zur Rohmilch nicht gehindert. Doch traten die Farbenunterschiede auch bei dieser günstigeren Modifikation der Probe im Vergleich zu der Storch'schen und der Ursolreaktion immer nur recht schwach auf. Aus diesem Grunde zeigte das Verfahren eine grosse Unzuverlässigkeit bei pasteurisierter, namentlich über 75° erhitzt gewesener Milch, ferner auch bei Mischmilch, selbst wenn diese stärkere Rohmilchzusätze (20 bis 50 %) enthielt.

Das Metadiamidobenzol ist demnach als Milchreagens nicht zu gebrauchen.

9. Die Dupouy'schen Reagentien.

Von den Dupouy'schen Reagentien behielt ich die 1%ige wässerige Guajakollösung[2]) zunächst bei, ebenso gebrauchte ich die 10%ige Konzentration des Brenzkatechins[3]). Ferner wurde von dem Paraphenylendiamin nach der Vorschrift des Autors zu jeder Probe ein wenig in Wasser aufgelöst und mit dem gleichen Volumen Milch vermischt. Das Hydrochinon[4]) vermochte sich in dem Verhältnis 10 : 100, wie es Dupouy verlangt, in Wasser (auch in heissem) nicht vollständig zu lösen, jedoch lieferte es schon in 5%iger Konzentration recht günstige Resultate. Von dem α — Naphtol[5]) wurden 2 bis 3 Messerspitzen zu

---

[1]) Metaphenylendiamin Purum Cryst. (Metadiamidobenzol). von E. Merck-Darmstadt.
[2]) Guajacol chem. pur. cryst. synthet. von E. Merck-Darmstadt.
[3]) Pyrocatechin bisublimatum (Brenzkatechin). von E. Merck-Darmstadt.
[4]) Hydrochinon purissimum. von E. Merck-Darmstadt.
[5]) α-Naphtol recryst. albiss. pro analysi. von E. Merck-Darmstadt.

Tabellen

zu den Reaktionen nach Dupouy.

(R bis U.)

etwa 50 ccm Wasser getan, und hiervon die zur Probe benötigte Menge (ca 3 ccm auf ebensoviel Milch) entnommen.

Neben den Dupouy'schen Stoffen versuchte ich dann noch das bereits von Siegfeld geprüfte Pyrogallol[1]) in 2%iger wässeriger Lösung.

Die mit diesen Reagentien und 10%igem Wasserstoffsuperoxyd ausgeführten Versuche, zu welchen gegen 50 verschiedene, zunächst durch die fraglichen Methoden als roh erkannte Vollmilchproben verwandt wurden, finden sich in Tabelle R in Kürze geordnet.

Danach zeigten sich die Dupouy'schen Reagentien recht verschieden wirksam.

So erwies sich vor allem das α-Naphtol schon bei Milch, welche nur bis 75° erwärmt worden war, und ebenso bei Mischmilch mit dem doch verhältnissmässig hohen Gehalt von 30 % roher Milch recht unsicher.

Das Guajacol setzte nach kurzem Erhitzen der Milch bei 75° ebenfalls aus; ferner liess es Zusätze von 20 % roher zur stark erhitzten Milch nur ganz vereinzelt, noch geringere Rohmilchbeimischungen überhaupt nicht mehr erkennen.

Die Lösungen von Hydrochinon, Brenzkatechin und Pyrogallol zeitigten bessere und im wesentlichen übereinstimmende Resultate. Zwar verloren auch diese Reagentien an Zuverlässigkeit, nachdem eine Milch längere Zeit bei 75° und darüber pasteurisiert worden war, doch kennzeichneten sie Mischmilch mit 5 % Rohmilchgehalt immer noch deutlich.

Im Gegensatze zu allen gab aber die Dupouy'sche Paraphenylendiaminprobe selbst dann sichere Reaktionen, wenn die Milch bis nahe an 80° gebracht oder nach starkem Erhitzen mit nur 2 % roher versetzt worden war.

Weiterhin erfolgte der Eintritt der Reaktion beim α-Naphtol in roher Milch durchschnittlich nach 2 bis 5 Minuten und schwankte entsprechend bei mangelhaft erhitzter Milch oder Mischmilch, soweit eben hier eine Färbung zu erhalten war, zwischen 3 bis 10 Minuten.

Mit Guajacol, Hydrochinon, Brenzkatechin und Pyrogallol kam die Reaktion der Rohmilch in ½ bis 1 Minute auf das maximum, während auf höhere Temperaturen pasteurisierte Milch, sowie Gemische mit weniger als 10 % roher Milch 5 bis 10 Minuten kontrolliert werden mussten.

Auf das Paraphenylendiamin reagierte rohe und mässig pasteurisierte Milch, ferner noch Zusätze von 5 % roher zur gekochten Milch binnen weniger Augenblicke intensiv; alle anderen mit dem Reagens ausführbaren Reaktionen (Tabelle R) waren in 3, spätestens in 5 Minuten deutlich zu erkennen. — Somit steht, was Sicherheit und Schärfe betrifft, das Paraphenylendiamin auch unter den Dupouy'schen Reagentien an erster Stelle, wenngleich die anderen Verfahren, ausgenommen das α-Naphtol, unter den vermerkten Einschränkungen sehr wohl brauchbar sind. Jedoch besitzen die Lösungen des Hydrochinons, Brenzkatechins, Pyrogallols und α-Naphtols nur eine geringe Haltbarkeit. Sie verfärbten sich selbst im Dunkeln binnen wenigen Tagen

[1]) Acidum Pyrogallicum bisublimat. pro analysi (Pyrogallol). von E. Merck-Darmstadt.

Tabelle V:

Reagens	Bei der Probe gemischt		Reaktionen der Vollmilch									
			Rohe	Pasteurisierte			Gekochte	Mischmilch mit % roher				
				auf 75°	auf 78 bis 79°	gleichm. auf 80°		10%	5%	3%	2%	1%
5 %-ige Guajakollösung in Alkohol	ca. 5 ccm Milch + 1 ccm Guajakollösung + 1 Tropfen Wasserstoffsuperoxyd von %:	10%	stark orange-rot, 1 bis 2 Min.	matt orange, 3 bis 5 Min.	0	0	0	0	0	0	0	0
		1%	stark orange-rot, 1/2 Min.	orange, 1 bis 2 Min.	unsicher	0	0	orange, 2 bis 3 Min.	unsicher, 5 bis 10 Min.	0	0	0
10 %-ige Guajakollösung in Alkohol		10%	stark orange-rot, 1 bis 2 Min.	matt orange, 3 bis 5 Min.	0	0	0	0	0	0	0	0
		1%	stark orange-rot, 1/2 Min.	orange, 1 bis 2 Min.	unsicher	0	0	orange, 2 bis 3 Min.	unsicher, 5 bis 10 Min.	0	0	0
		0,2%	sehr kräftig orange, wenige Sek.	orange, 1/2 bis 1 Min.	matt orange, ca. 5 Min.	0	0	orange, 1 bis 2 Min.	matt orange, 2 bis 5 Min.	unsicher, 5 bis 10 Min.	sehr unsicher, 15 bis 20 Min.	0

stark, wiewohl sie in diesem Zustande für eine geraume Zeit noch verwendet werden konnten. Dagegen war die Guajakollösung noch nach 7 Monaten farblos, und ebenfalls das unter den gleichen Bedingungen im Trockengläschen aufbewahrte Paraphenylendiamin nach derselben Zeit unverändert wirksam.

Da es hiernach zweckmässiger ist, statt der zersetzlichen Storch'schen Lösung geringe Mengen frisch in Wasser gelösten Paraphenylendiamins zu verwenden — oder besser die Substanz der Milch direkt zuzusetzen —, versuchte ich den Dupouy'schen modus noch nebst 0,2%igem Wasserstoffsuperoxyd. Desgleichen beschäftigte ich mich eingehender mit dem von Raudnitz und Kollo dem Paraphenylendiamin vorgezogenen[1]) Guajacol. Denn es besitzt dieses Reagens auch die Vorteile, dass die Farbenerscheinung nicht durch die Milchsäure beeinflusst wird, und dass Verfärbungen von stark erhitzter Milch, wie sie bei dem Storch'schen, dem Utz'schen und den anderen Dupouy'schen Verfahren nach längerem Stehen solcher Proben auftreten, ganz ausgeschlossen sind.

Zunächst wurden einige Vorversuche angestellt, um für die Guajakollösung sowie für das daneben zu benutzende Wasserstoffsuperoxyd eine passende Konzentration zu ermitteln. (Tabele V).

Hierbei zeigte sich, dass die Guajakolreaktion in Mischmilch und pasteurisierter Milch durch stärkere Wasserstoffsuperoxydlösungen wesentlich beeinträchtigt wird, während dieselbe in roher Milch zwar verzögert, aber sehr kräftig erfolgt. Auch wird das Verfahren in den erstgenannten Fällen nur dann scharf und zuverlässig, wenn man im Gegensatz zu Dupouy eine starke Guajakollösung gebraucht. Zufriedenstellende Ergebnisse erhielt ich jedoch erst mit den entsprechenden Mengen (1 ccm, 1 Tropfen) einer 10%igen Guajakollösung (in Alkohol) und 0,2%igen Wasserstoffsuperoxydes.

Letztere Modifikation wurde infolgedessen zugleich mit der abgeänderten Paraphenylendiaminprobe noch bei Magermilch, Rahm, Buttermilch und Molke geprüft. Die Versuche verliefen auch hier ausnahmslos sehr günstig, und es sind aus den in den Tabellen S bis U niedergelegten Resultaten für die Paraphenylendiamin- sowie für die Guajakolprobe folgende Schlüsse zu ziehen:

1. Durch die Kombination der Storch'schen und der Dupouy'schen Methoden lässt sich die zersetzliche Paraphenylendiaminlösung ohne Bedenken für die Praxis vermeiden. Zu jeder Probe wird eine geringe Menge Paraphenylendiamin frisch in Wasser gelöst und nebst 1 Tropfen Wasserstoffsuperoxyd (0,2 %) im gleichen Volumen mit der Milch vermischt. Sämtliche nach Storch ausführbaren Reaktionen sind auch mit der modifizierten Paraphenylendiaminprobe in wenigen Sekunden bis spätestens 5 Minuten zu erhalten. Ausserdem tritt hier die Reaktion im Beginn bestimmter, insbesondere aber bei der Molke deutlicher auf.

2. Die Guajakolprobe ist von ähnlicher Schärfe wie das Paraphenylendiaminverfahren, wenn neben einer starken Lösung des Reagenzes Wasserstoffsuperoxyd von geringem Gehalt verwendet wird. Mit ½ bis 1 ccm (= ca 10 bis 20 Tropfen) einer 10%igen Guajakollösung

[1]) cf. S. 44 und 45.

in Alkohol und 1 bis 2 Tropfen Wasserstoffsuperoxyd (0,2 %) lässt sich jede nicht auf 80° pasteurisierte, desgleichen noch Gemische mit 5 % roher Milch — auch in der Molke davon — zuverlässig erweisen.

3. Die orangerote (bei stärker erhitzt gewesener Milch und Mischmilch bisweilen fleischfarbene) Guajakolreaktion erfolgt je nach der Höhe des Pasteurisierens, oder dem Rohmilchgehalte in Gemischen, innerhalb weniger Sekunden resp. Minuten. In den zweifelhaften Fällen, und bei Rücksichtnahme auf Rohmilchzusätze unter 5 %, ist die Kontrolle auf mindestens 10 Minuten auszudehnen.

4. Magermilch und Rahm verhalten sich der Guajakolprobe gegenüber wie Vollmilch. Buttermilch versagt die Guajakolreaktion nach gleichmässiger Erhitzung auf 75°, Molke dieselbe bereits bei 70°.

Auch Mischmolke ist bis zu Zusätzen von 5 % des rohen Produktes noch deutlich zu erkennen.

5. Das Guajakolverfahren stellt sich verhältnismässig billig. 100 g krystallisiertes Guajakol kosten etwa 2,50 Mk. Der im Vergleich zu anderen Verfahren stärkere Verbrauch an Lösung wird durch die Haltbarkeit der letzteren reichlich aufgewogen. Denn die Guajakollösung in Alkohol lässt sich, wenn sie gut verschlossen und vor Licht geschützt aufbewahrt wird, unbegrenzt verwenden.

10. Die Jodkaliumstärkeprobe.

Für die Prüfung des Jodkaliumstärkeverfahrens diente die von du Roi und Köhler empfohlene Mischung von 2 bis 3 g in einer Wenigkeit destillierten Wassers gelöstem Jodkalium und 2 bis 3 g in 100 ccm heissen Wassers gelöster Stärke. Bei der Probe wurden vorschriftsmässig 50 ccm Milch mit 1 ccm Wasserstoffsuperoxyd gemischt und in gleichem Volumen (je 2 bis 3 ccm) mit dem Jodkaliumstärkekleister im Reagensgläschen umgeschüttelt.

A. Versuche mit 1%igem Wasserstoffsuperoxyd.

Bei den zunächst nach du Roi und Koehler mit 1 ccm 1%igen Wasserstoffsuperoxydes begonnenen Versuchen färbte sich rohe Milch im Moment schwarzblau, leider aber auch die gekochte Milch in jedem Falle in spätestens 2 Minuten ebenso intensiv.

Selbst 1 Tropfen von dem 1%igen Wasserstoffsuperoxyd erzeugte, zu wenigen ccm Jodkaliumstärkekleister gegeben, stets schon mit diesem allein, natürlich erst recht nach dem Zusatze von Rohmilch eine tiefblaue Reaktion. In gekochter Milch waren an die Reaktion erinnernde Färbungen innerhalb 5 Minuten noch nicht zu bemerken, sodass sich das 1%ige Wasserstoffsuperoxyd in dieser „minimalen Gabe" (auf ein Gemisch von je 2 bis 3 ccm Milch und Jodkaliumstärkekleister) sehr wohl gebrauchen lässt.

Zunehmende Säuerung begünstigte den Eintritt von Reaktionen zwischen Jodkaliumstärkekleister und Wasserstoffsuperoxyd in gekochter Milch. Zur Vermeidung von Täuschungen ist daher auch bei der Jodkaliumstärkeprobe jede in saurem Zustande zur Untersuchung gelangende Milch zunächst mit Kalkwasser zu versetzen.

B. Ergebnisse mit 0,1%igem und 0,05%igem Wasserstoffsuperoxyd.

Für die weiteren Versuche verwandte ich 0,1%iges Wasserstoffsuperoxyd, welches von Utz[1]) bevorzugt wird, sowie auch eine nur 0,05%ige Lösung des Oxydationsmittels. Beide wurden zur Milch gleichfalls im Verhältnis 1 : 50 hinzugefügt. Rohe wie ungenügend erhitzte Milch erforderten hiernach eine schnelle Durchmischung mit dem Jodkaliumstärkekleister, weil diese geringen Wasserstoffsuperoxydmengen, insbesondere von der schwachen Konzentration, binnen wenigen Minuten zersetzt und damit unwirksam wurden.

Mit dem 0,1%igen Wasserstoffsuperoxyd konnte ich die günstigen Erfahrungen von Utz bestätigen. (cf. Tabelle W).

Rohe oder mässig erhitzt gewesene Milch gab bei dieser Probe in wenigen Sekunden eine starke, meist tiefblaue Reaktion. Bei 0,05%igem Wasserstoffsuperoxyd war letztere nur rötlich-blaugrau und binnen kurzem wieder abgeblasst. Die Reaktion wurde auch durch starke Wasserzusätze (bis 90 %) nicht abgeschwächt. Im Gegenteil fielen, wie das namentlich bei der Modifikation mit 0,05%igem Wasserstoffsuperoxyd zu beobachten war, die Reaktionsfärbungen mit zunehmendem Wassergehalt sogar intensiver und haltbarer aus.

Gleichmässig auf 80° und höher erhitzte Milch blieb innerhalb der nach Utz für die Probe hinreichenden Beobachtungszeit von 5 Minuten unverändert. Die erst nach längerem Stehen auftretenden Farbenänderungen liessen sich demnach mit der Reaktion nicht verwechseln.

In der zwischen 75 bis 79° pasteurisierten Milch, ebenso bei Gemischen mit weniger als 10 % Rohmilch, erfolgte auch mit derUtz'schen Wasserstoffsuperoxydlösung die Reaktion nicht mehr ausgesprochen blau, sondern in rotbläulichen bis rotbräunlichen oder auch nur rötlichen Nüancen. Jedoch waren mit dieser Modifikation stets noch 2 % roher in genügend erhitzter Milch zuverlässig zu erkennen. Mit 0,05%igem Wasserstoffsuperoxyd hörte die Sicherheit und die Deutlichkeit der Reaktion bereits bei Gemischen mit etwa 10 % roher Milch auf. —

Zur Aufbewahrung des Jodkaliumstärkekleisters benutzte ich auch die von Soltsien[2]) empfohlene Vorrichtung. Der Jodkaliumstärkekleister wurde also in einem geräumigen, mit Stopfen nebst knieförmig gebogenem Glasrohr versehenen Kolben mehrmals aufgekocht, danach die Oeffnung sofort mit steriler Watte verschlossen, und der Apparat bei Nichtbenutzung vollkommen im Dunkeln gehalten. Indessen scheint selbst bei dieser Behandlungsweise eine lange Haltbarkeit des Jodkaliumstärkekleisters nicht immer gesichert zu sein, denn ich fand letzteren trotz aller Sorgfalt in einigen Fällen schon nach wenigen Wochen stark zersetzt.

Resümee:

Die Jodkaliumstärkeprobe ist nur bei vorsichtiger Anwendung stark verdünnten Wasserstoffsuperoxydes zuverlässig, vermag aber auch dann jede mangelhaft erhitzte Milch deutlich zu kennzeichnen. Andererseits hat man auf nicht genauestens erprobte Wasserstoffsuperoxyd-

[1]) Utz. cf. S. 46.
[2]) cf. S. 47 ff.

Tabelle W: Ueber die Jodkaliumstärkeprobe mit 0,1%igem und 0,05%igem

Anstellung der Probe		Rohe Milch					Gekochte Milch		Sterilisierte Milch
		Normal (50 Proben)	Mit % Wasser versetzt				Normal	mit 50% Wasser verdünnt	
			20%	50%	70%	90%			
50 ccm Milch mit 1 ccm Wasserstoffsuperoxyd gemischt, hiervon 3 ccm mit der gleichen Menge Jodkaliumstärkekleister geschüttelt.	a. Wasserstoffsuperoxyd (0,1%)	stark blau, wenige Sek.	stark blau	stark blau	stark blau	stark blau, wenige Sek.	0	0	0
	b. Wasserstoffsuperoxyd (0,05%)	rötlich blaugrau, wenige Sek.	rötlich blaugrau	rötlich blaugrau	rötlich blaugrau	rötlich blaugrau, wenige Sek.	0	0	0

mengen auch in gekochter Milch deutliche Reaktionen (zwischen Jodkaliumstärkekleister und Wasserstoffsuperoxyd), und in solchen Fällen gerade bei dem Jodkaliumstärkeverfahren die schwersten Täuschungen zu gewärtigen. Empfehlenswert ist die von Utz vorgeschlagene Modifikation mit 0,1%igem Wasserstoffsuperoxyd. Lösungen von noch geringerem Gehalt an diesem Stoffe liefern wenig intensive, allzuschnell vorübergehende Reaktionen und sind aus diesen Gründen bei Mischmilch wenig tauglich. Der leichtzersetzliche Jodkaliumstärkekleister ist zweckmässig nur in kleinen Mengen (50 bis 100 ccm) herzustellen.

11. Die Milchprüfung nach Schardinger.

Von den Schardinger'schen Reagentien kam vor allem die zur Zeit nur mehr allein berücksichtigte Methylenblau - Formalinlösung in Betracht. (Tabelle X).

Indes versuchte ich neben dieser bei sämtlichen Milchproben auch die reine Methylenblaulösung, welcher nach den Ergebnissen Schardinger's nur ein bedingtes Reaktionsvermögen beizumessen ist.[1]) Beide Lösungen wurden vorschriftsmässig hergestellt und erwiesen sich nach 1 Jahre unverändert wirksam.[2]) In Ausführung der Probe wurde von den Reagentien 1 ccm mit je 20 ccm Milch in Reagensgläschen umgeschüttelt, und diese gleichzeitig in ein Wasserbad von 45 bis 50° gestellt. Da gemäss den bisherigen Nachprüfungen mit einer längeren Beobachtungszeit zu rechnen war, wurde letztere, um in jedem Falle sicher zu gehen, bei normaler roher und gekochter Milch auf 1 Stunde, bei verwässerter, pasteurisierter, Mischmilch sowie saurer Milch auf 2 bis 4 Stunden ausgedehnt.

[1]) cf. S. 47 u. 48 ff.

[2]) Anilin-Blau (Methylen-), „chemisch rein und chlorzinkfrei" v. E. Merck-Darmstadt.

Wasserstoffsuperoxyd.

Pasteurisierte Milch					Mischmilch mit % Rohmilchgehalt						
auf 70°	eben auf 75°	gleichmässig auf 75°	eben auf 79°	gleichmässig auf 80° und höher	50%	20%	10%	5%	3%	2%	1%
stark blau, wenige Sek.	blau, wenige Sek.	rötlich bis rötlich-blau, ca. 5 Min.	rötlich bis rötlich blau, ca. 5 Min.	0	stark blau, wenige Sek.	blau, 1/2 Min.	blau, 1 Min.	rotbläulich bis rötlich, 2 bis 5 Min.			unsicher
rötlich blau-grau, wenige Sek.	rötlich blau, 1/2 Min.	0	0	0	rötlich blau-grau, 1/2 Min.	rötlich bis rotbläulich, 2 Min.	rötlich, 5 Min.	unsicher	negativ		

Rohmilch.

Sämtliche Proben roher Milch (ca 50) entfärbten die Methylenblau-Formalinlösung ausnahmslos, während die mit der reinen Methylenblaulösung gemischte Milch keine Aenderung erfuhr. Die Zeit, innerhalb welcher die allmählich zur Oeffnung des Reagensgläschens aufsteigende Reduktion der Blaufärbung vor sich ging, war eine ungleich verschiedene und schwankte zwischen ungefähr 8 bis 20, im Mittel zwischen 10 bis 12 Minuten. Ein nicht in Leukomethylen übergeführter Rest des Farbstoffes blieb als eine ca 0,5 bis 1 cm breite blaue Zone an der Oberfläche der Milch beständig. Beim Schütteln der weiss gewordenen Milchproben stellte sich die Blaufärbung schnell wieder her und verschwand abermals, wenn die Gläschen von neuem im Wasserbade untergebracht wurden. Indes vollzog sich die Reduktion der durch Luftzutritt wieder gefärbten Proben auch nach längerem Stehen bei Zimmertemperatur, wie das bereits Schardinger festgestellt hat. Schwach oder mässig saure Milch entfärbte die Methylenblau-Formalinlösung ebenfalls noch stets, wobei der Prozess um so langsamer verlief, je stärker sich die Säuerung in der Milch bemerkbar machte. Durch ältere Rohmilch wurde in der Regel auch die reine Methylenblaulösung reduziert. Mit längerem Stehen der Milch ging hier sogar die Reaktion bisweilen schneller als bei der Methylenblau-Formalinlösung von statten. Auch wurden öfters durch sauer gewordene Milch beide Reagentien nur unvollkommen entfärbt, indem grössere blaue Flecke zurückblieben, die Reduktion nur zur Hälfte usw. resp. nur an einzelnen Stellen der Milchproben erfolgte, oder das kräftige Blau der zugesetzten Lösungen lediglich in einen hellen Ton überging. Säuerung im Uebermass unterdrückte die Wirksamkeit der Milch gegenüber den Schardinger'schen Lösungen ganz. Hier stellten schwache Zusätze von Kalkwasser oder Neutralisation der Milch die normalen Verhältnisse wieder her.

Tabelle X: Versuche mit Schardingers Methylenblau-Formalinlösung.

Probe	Rohe Milch						Gekochte Milch		Sterilisierte Milch	Pas-
	normal	mit % Wasser versetzt					normal	mit 50% Wasser verdünnt		auf 60°
		20%	50%	70%	80%	90%				
1 ccm Methylen-blau-Formalinlösung mit 20 ccm Milch im Reagensglase gemischt und in ein Wasserbad von 45 bis 50° C gestellt.	Entfärbung	Entfärbung	Entfärbung	0	0	0	0	0	0	Entfärbung

Geringe Wasserzusätze liessen auf das Reduktionsvermögen der Rohmilch bei Methylenblau-Formalinlösung keine Einflüsse, solche von 20 bis 50 % mit steigendem Wassergehalt zunehmende Verzögerungen des Entfärbungsvorganges bemerken. In noch stärkerem Masse verdünnte Rohmilch äusserte die Reaktionsfähigkeit unsicher; durch Beimischungen von 70. 80 und 90 % Wasser wurde letztere ganz unterdrückt.

Gekochte und sterilisierte Milch.

Gekochte, sowie sterilisierte Milch brachte an sich keine Reduktionserscheinungen hervor. Wohl aber fand ich in sämtlichen Fällen die Utz'sche Erfahrung bestätigt, dass in gekochter Milch die Schardinger'sche Reaktion zustande kommt, wenn man die Milch alkalisch macht.

Die Entfärbungserscheinungen zeigten sich jedoch auch in jeder anderen nicht reaktionsfähigen Milch (z.B. mit Wasser versezten Milch, pasteurisierten Milch, Mischmilch) nach entsprechenden Zusätzen von Kalkwasser bei „beiden" Lösungen.

Pasteurisierte Milch.

Nach dem Erwärmen auf 60 bis 70° verhielt sich die Milch der Methylenblau-Formalinlösung gegenüber noch wie vollkommen rohe.

Eben auf 75° pasteurisierte Milch entfärbte sich erst nach längerem Stehen (bis zu 1 Stunde und mehr) im Wasserbade.

War dagegen die Erhitzung bei 75° auf 15 Minuten ausgedehnt resp. auf 79° oder 80° gesteigert worden, so blieben die Milchproben selbst bei vierstündiger Kontrolle unverändert blau. In diesen Fällen erzielten auch spätere Versuche mit der aufgehobenen Milch nur negative Ergebnisse.

Mischmilch.

Genügend erhitzte Milch mit 60 % und noch höheren Rohmilchzusätzen war durchweg sicher zu erkennen.

Tabelle X.

teurisierte Milch					Mischmilch mit % roher							
auf 70°	eben auf 75°	15 Min. auf 75°	auf 79°	gleichmässig auf 80° und höher	60% und mehr	50%	40%	30%	20%	15%	10%	5%
Entfärbung	Entfärbung	0	0	0	Entfärbung	Entfärbung, ziemlich zuverlässig	Entfärbung, unsicher resp. unvollkomm.	Entfärbung, sehr unsicher bezw. unvollkomm.	0	0	0	0

Ebenso gaben Gemische mit 50 % unerwärmter Milch die Schardinger'sche Reaktion ziemlich zuverlässig, indem unter den angestellten Proben über neunzig vom Hundert die Methylenblau-Formalinlösung zu entfärben vermochten. Hierbei war der Reduktionsvorgang bisweilen schon in 30 Minuten, vereinzelt erst mit 90 und in der Regel gegen 45 Minuten beendet.

Der Nachweis von 40 % roher in Mischmilch gestaltete sich bereits schwieriger; indes liess er sich noch zu etwa der Hälfte der Versuche in 1 bis 3 Stunden erbringen.

Weit unsicherer resp. selten erzeugten Proben, die aus genügend erhitzter und 30 % roher Milch hergestellt worden waren, mehr oder minder vollkommene Reaktionen.

Hingegen blieben diese bei 20 % und noch geringeren Rohmilchzusätzen gänzlich fort, trotzdem die Reagensgläser bis zu 4 Stunden bei der vorgeschriebenen Temperatur im Wasserbade belassen, und derartige Milch auch in höherem Alter wiederholt geprüft wurde. —

Bei der Methylenblaulösung ohne Formalin traten Reaktionserscheinungen in verwässerter, sowie in pasteurisierter und in Mischmilch — ausgenommen nach dem oben erwähnten stärkeren Zusatz von Alkalien — ebenfalls nur mit zunehmendem Alter solcher Milch ein.

Saure Molke brachte bei der Schardinger'schen Probe keine Entfärbung hervor, sie offenbarte aber ihr Reaktionsvermögen stets nach dem Vermischen mit Kalkwasser. —

Hiernach kann ich die Schardinger'schen Erfahrungen sowie die Brauchbarkeit seiner Methylenblau-Formalinlösung voll bestätigen. Jedoch lassen sich der Schardinger'schen Probe folgende Mängel nicht aberkennen, wie sie das Storch'sche, das Utz'sche, das Guajakolverfahren u. a. nicht besitzen:

1. Eine gewisse Umständlichkeit (Messgläser oder Pipetten, Wasserbad), welche die Methode für eine Massenkontrolle wenig geeignet macht.

2. Die lange Beobachtungszeit, weil häufig, z. B. in Rücksichtnahme auf Mischmilch mit geringerem Rohmilchgehalt (unter 40 %),

eine stundenlange Kontrolle erforderlich würde, wogegen derartige Reaktionen mit jenen Verfahren, welche auf dem Nachweis des durch ungenügend erhitzte Milch zersetzten Wasserstoffsuperoxydes beruhen, binnen wenigen Sekunden und Minuten sicher und deutlich zu erhalten sind.

3. Ihre relativ geringe Brauchbarkeit bei der Mischmilch, denn Zusätze von 20 bis 2 % roher zur genügend erhitzten Milch, welche bei der Storch'schen und der Utz'schen Probe in längstens 5 Minuten zuverlässig erkannt werden, sind mit der Methylenblau-Formalinlösung nicht zu erweisen.

4. Der Eintritt der Reaktion bei alkalisch gemachter gekochter Milch, wodurch beim Zusatz von Kalkwasser und dergleichen zur nicht reaktionsfähigen sauren Milch oder Molke grosse Vorsicht und Uebung bezw. eine Nebenkontrolle durch andere Verfahren bedingt wird.

12. Die Entbehrlichkeit von Konservierungsmitteln und das Verhalten der Milch in Verfälschung mit Rhodanammonium.

Dass die geschilderten Verfahren auch brauchbar sind, wenn der Milch Formalin und andere Konservierungsmittel zugesetzt werden, ist bereits von den einzelnen Autoren und durch frühere Nachprüfungen gezeigt worden. Speziell hat Weber bei der Guajakprobe und dem Storch'schen Verfahren eingehend dargelegt[1]), dass die gebräuchlichen Konservierungsmittel in dem geringen Masse, wie sie im Milchverkehr, ohne den Geschmack und das Aussehen der Milch zu schädigen, nur angewendet werden können, die Reaktion nicht beeinflussen. Einmal aus diesen Gründen habe ich von derartigen Prüfungen abgesehen. Ausserdem ist durch vorliegende Versuche zur Genüge festgestellt worden, dass die einzelnen Reaktionen auch mit sauer gewordener Milch und ebenso zuverlässig mit der aus geronnener Milch gewonnenen Molke zu erhalten sind, wenn man die Proben davon entsprechend mit Alkalien versetzt resp. neutralisiert. Hiernach lässt sich aber das Konservieren der Milch für spätere Versuche, somit auch etwaige auf die beigemischten Substanzen zurückzuführende Täuschungen bequem vermeiden.

Wichtiger erschienen mir einige Versuche mit Rhodanammonium, weil nach Raudnitz[2]) durch Rhodansalze die Oxydasereaktion der Milch gehemmt wird, somit die Wirkung auf Peroxyde fortbleibt, und sich rohe wie genügend erhitzte Milch verhält. Nach Raudnitz genügt hierzu bereits 1 g Rhodanammonium auf 10 Ltr. Milch. Utz[3]) fand, dass beim Zusatz von 10 % einer Rhodanammoniumlösung 8 : 1000 die Storch'sche Reaktion nicht eintrat, während die Ursolreaktion in der gleichen Stärke wie bei unverfälschter Rohmilch und sogar noch bei Anwendung von 50 % der Lösung sehr prompt, wenn auch nicht so intensiv, erschien. Er hebt infolgedessen die Sicherheit seines Verfahrens in derartigen Fällen hervor. Lauterwald[4]) machte die gleichen Erfahrungen wie Utz und erklärt, dass man mindestens 0,08 g Rhodan-

---

[1]) cf. S. 18 u. 32.
[2]) S. 35.
[3]) S. 35.
[4]) cf. S. 38. ff.

Tabelle Y:

Versuche mit Rhodanammonium.



ammonium pro 1 Ltr. Milch verwenden müsse, um die Storch'sche Reaktion zu verhindern, welche Angabe sich somit mit der Raudnitz'schen ungefähr deckt.

Bei den eigenen Versuchen setzte ich der Milch 0,008 und 0,05 %, also in letzterem Falle eine beträchtliche Menge Rhodanammonium zu und prüfte damit die Guajakringprobe, die Guajakolmethode und die als besonders scharf befundenen Paraphenylendiamin- und Ursolverfahren in ihren oben beschriebenen Modifikationen. Die hierbei erhaltenen sehr günstigen Ergebnisse sind aus Tabelle Y ersichtlich.

Zu dieser ist noch folgendes zu bemerken:

Der Rhodanammoniumzusatz von 0,008 % liess auf die Guajakringprobe nur eine geringfügige Einwirkung bemerken, insofern als bei einigen unter ca. 30 geprüften Holztinkturen sich der Eintritt der Reaktion bis zu 2 Minuten verzögerte. Die entstandenen Zonen waren jedoch sämtlich kräftig und nach 15 Minuten noch zu erkennen.

Bei Rohmilch mit 0,05 % Rhodanammonium und der Molke davon erfolgte die Guajakreaktion bereits recht unsicher. Auch waren die vereinzelt aufgetretenen Zonen sehr schwach, von grünlicher Färbung und in kurzer Zeit wieder abgeblasst. Weiterhin nahmen nach längerem Stehen die, an der Berührungsstelle von Guajaktinktur und Molke gebildeten, mischfarbenen Ringe durchweg (bei entstandener Reaktion nach deren Verschwinden) ein orangerotes Aussehen an, welches sich bei der Molke mit dem niedrigeren Rhodanammoniumgehalt nicht gezeigt hatte und daher bei der Vergewisserung über grössere Zusätze an diesem Salze nicht ohne Bedeutung sein dürfte.

Die Guajakol- und Ursolreaktion wurde von beiden Rhodanmengen nicht beeinflusst, ebensowenig aber auch die Storch'sche, welche nach den Beobachtungen von Utz und Lauterwald zum mindesten durch den stärkeren Zusatz (von 0,05 %) hätte verhindert werden müssen. Vielmehr wirkte, was Schnelligkeit und Deutlichkeit anlangt, die Paraphenylendiaminprobe hier und auch in der Molke wie bei den unverfälschten Produkten. —

Somit stehen meine Ergebnisse denen obiger Forscher diametral gegenüber, sodass ich das Fortbleiben der Storch'schen Reaktion selbst bei stärkeren Rhodanzusätzen wenigstens als ein unsicheres resp. bedingtes bezeichnen muss, wie das in ähnlicher Weise bereits Wirthle[1]) gefunden hat. Auch bleibt es noch abzuwarten, ob die Rhodanverbindungen bei ihrer Giftigkeit, wenn überhaupt, zu genannten Täuschungen je Verwendung finden werden. Die sonst zuverlässige Storch'sche Probe aber schon auf Vermutungen hin fallen zu lassen, und bevor dieselbe bei Milch mit Rhodanzusätzen nicht erst reichliche Erfahrungen gezeitigt hat, halte ich für ungerecht. Ueberdies lassen sich beigemischte Rhodansalze leicht und sicher durch Eisenchlorid nachweisen, mit welchem man die verdächtige Milch zweckmässig in Form der Schichtprobe versetzt. Je nachdem geringere oder stärkere Mengen von Rhodan in der Milch enthalten sind, entsteht dann an der Berührungsstelle eine orangerote bis tiefblutrote Reaktion. Unverfälschte Milch hingegen zeigt nur die von Eisenchlorid herrührende mattgelbe Farbe.

[1]) cf. S. 35 ff.

Schlusswort.

Da die Guajakringprobe auch in neuerer Zeit noch öfter angegriffen wird, habe ich in Schlusstabelle Z meine Ergebnisse mit derselben nochmals kurz zusammengefasst und den Resultaten der ebenfalls empfehlenswerten Guajakolmethode, sowie der Paraphenylendiamin- und der Ursolprobe gegenübergestellt.

Hiernach sind letzgenannte Verfahren in den vermerkten Anwendungsformen als sehr scharf und zuverlässig zu bezeichnen. Aber auch die Guajakringprobe ist innerhalb weiter Grenzen brauchbar. Wegen ihrer Einfachheit, geringen Kostspieligkeit und vor allem wegen der grossen Haltbarkeit[1]) der Tinktur kann sie in Laboratorien und Kontrollstationen sehr gut als Orientierungs- bezw. Vorprüfungsmittel verwandt werden, indem jede zur Prüfung gelangende Milch zunächst der Ringprobe mit Guajakholztinktur unterworfen wird. Tritt die blaue Zone ein, so ist je nach deren Intensität und Breite die Milch entweder ganz roh bezw. sehr mässig erhitzt, oder nur ganz kurze Zeit auf 75° gebracht, eventuell auch nach starkem Erhitzen mit mindestens 20 % Rohmilch vermischt worden. Eine weitereUntersuchung solcher zu beanstandender Milch erübrigt sich damit. Entsteht dagegen die Guajakbläuung in 5 Minuten nicht, so ist die Prüfung mit einer der oben genannten schärferen Farbenreaktionen weiterzuführen und zu ermitteln, ob die Milch tatsächlich bis zum Ausbleiben jeglicher Farbenerscheinung, d. h. wenigstens gleichmässig auf 80° gebracht worden ist. Hierbei vermag die Guajakolmethode noch 5 %, die Storch'sche und die Utzsche Probe noch 2 % roher in genügend hoch erhitzter Milch in 5 Minuten sicher zu kennzeichnen. Es sind demnach auch diesen Verfahren gewisse Grenzen gesetzt, sowohl hinsichtlich Mischmilch als auch namentlich in Betracht dessen, dass nach den neuesten Forschungen (vergl. Anm. 2. S. 9.) erst das Erhitzen bis auf 85° als zur Abtötung aller Infektionskeime genügend erachtet wird. Auch muss man immerhin damit rechnen, dass wer das Gebot der Milcherhitzung befolgt, d. h. bei ev. Prüfung den Ausschluss von der Molkerei oder das Verbot der Abgabe der Milch überhaupt fürchtet, schon an sich die Milch auf so hohe Temperaturen bringen wird, dass jegliche Farbenreaktion ausgeschlossen ist. Aus diesen Gründen ist die einfache Guajakringprobe besonders dort von hohem Werte, wo beim Ausbruch von Epidemieen und Seuchen ungeschultes Personal (die Gendarmen auf dem Lande) die Kontrolle auszuführen hat, oder sich auch der Laie davon überzeugen will, ob die von

[1]) Nach Abschluss der Arbeit wurde eine von einem Apotheker zur Verfügung gestellte Guajakholztinktur untersucht, die nach Angabe des Besitzers 8 Jahre alt sein sollte. Sie erwies sich noch sehr wirksam.




LIBRARY
OF THE
UNIVERSITY
OF
CALIFORNIA

der Behörde erlassenen Bestimmungen innegehalten werden. Was speziell den Landwirt angeht, so ist er in den Fachschulen und landwirtschaftlichen Vereinen sowohl über den Wert der Milcherhitzung wie auch über die zu ihrer Erkennung dienende Guajakreaktion eingehend zu unterweisen. Freilich muss man nicht immer wieder auf die in den Apotheken käuflichen, und dort häufig seit Jahren und bisweilen sogar Jahrzehnten lagernden, Guajaktinkturen zurückkommen, sondern wenn der Verkäufer für ein jüngeres Alter der Tinktur nicht gewährleisten kann, deren frische Herstellung betreiben oder solche selbst vornehmen, und zwar unter Bezug möglichst einwandsfreien (nicht alten) Guajakholzes. Landwirtschaftliche Vereine lassen das am zweckmässigsten durch einen Sachverständigen besorgen, der die reaktionsfähige Tinktur an die Mitglieder abgibt.

Anhang.

Nach Beendigung vorliegender Versuche erschien in Molk.-Ztg. Berlin 1906, Nr. 19 und 20 ein Referat von P. Buttenberg:[1]) „Zur Untersuchung der pasteurisierten Milch." Verfasser erläutert darin zunächst die Tatsache, dass in stärkerem Grade pasteurisierte Milch nach längerer unzweckmässiger Aufbewahrung für die menschliche Gesundheit gefahrbringend ist (Peptonisierende Bakterien). Des weiteren erklärt er bestimmte Methoden bei gleichzeitiger Anwendung für geeignet

a. die Höhe der stattgefundenen Erhitzung,
b. das Alter der pasteurisierten Milch zu erweisen, und damit jede nicht geeignete Milch von dem Konsum fernhalten zu können.

Um für den gedachten Zweck ein anschauliches Bild zu geben, wurden vom Versuchsansteller grössere Reihen von Milchproben unter verschiedenen Bedingungen pasteurisiert, und diePrüfung einmal nach der sofort vorgenommenen Abkühlung, dann weiter nach 24-stündiger Aufbewahrung im Eisschranke bezw. bei Zimmertemperatur ausgeführt. Ausserdem gelangte noch in verschiedenerlei Gefässen feilgehaltene Milch des Handels zur Untersuchung.

Zu den Prüfungen diente neben einigen Methoden zur Ermittelung des Bakteriengehaltes (Neisser-Wechsberg'sche Reaktion, Bestimmung der Keimzahl, Gärprobe von Bonnema) auch die Guajakringprobe und die Schardinger'sche Methylenblau-Formalinlösung.

Tabelle I und II enthalten in Kürze die Buttenberg'schen Ergebnisse über letztere beiden Verfahren, soweit seine Versuche zu meinen eigenen Beobachtungen in Beziehung gebracht werden können.

Tabelle I.

Art der Milch	Dauer und Höhe des Erhitzens	Guajakringprobe	Schardinger'sche Reaktion
Rohmilch	—	blau	Entfärbung
Erhitzte Milch	20 Min. auf 55°	"	"
	20 " " 60°	"	"
	20 " " 65°	"	"
	15 " " 70°	"	"
	20 " " 70°	"	"
	30 " " 70°	"	Innerhalb 1 Stunde nicht entfärbt
	15 " " 75°	negativ	
	20 " " 75°	"	
	10 " " 85° etc.	"	

[1]) Buttenberg. Mitteilung aus dem staatl. Hygienischen Institut Hamburg. Zeitschr. f. Unters. d. Nahr. u. Genussmittel 1906.

Tabelle II.

<table>
<tr><th rowspan="2">Art der Milch</th><th rowspan="2">Dauer und Höhe des Erhitzens</th><th>Guajakringprobe</th><th>Schardinger'sche Reaktion</th></tr>
<tr><th>sofort sowie nach 24-stünd. Aufbewahrung auf Eis wie bei Zimmertemperatur geprüft.</th><th>sofort sowie nach 24-stünd. Aufbewahrung auf Eis wie bei Zimmertemperatur geprüft.</th></tr>
<tr><td>Rohmilch</td><td>—</td><td>kräftig blau</td><td>Entfärbung</td></tr>
<tr><td>Erhitzte Milch</td><td>20 Min. auf 55°</td><td>„</td><td>„</td></tr>
<tr><td>„ „</td><td>20 Min. auf 65°</td><td>„</td><td>„</td></tr>
<tr><td>„ „</td><td>20 Min. auf 75°</td><td>negativ</td><td rowspan="2">innerhalb 1 Stunde noch unentfärbt</td></tr>
<tr><td>„ „</td><td>10 Min. auf 95°</td><td>„</td></tr>
</table>

Hierzu bemerkt Versuchsansteller:

1. ad Guajakringprobe:

Ueberschichtet man eine rohe bezw. eine niedrig oder mässig hoch erhizte Milch mit einer brauchbaren Guajaktinktur, so bildet sich an der Stelle der Berührung durch das Vorhandensein von oxydierenden Fermenten ein kräftig resp. schwach blauer Ring. Ist die Milch dagegen höher erhitzt, so macht sich nur eine schmutzig-graue Verfärbung bemerkbar. Der Eintritt der Reaktion erfolgt bei kalter Milch in etwa 10 Minuten[1]), wird beschleunigt bei Milch von Zimmertemperatur und ist ein sofortiger beim Aufwärmen auf etwa 20 bis 25°. Mit Hilfe der Guajaktinktur ist man in der Lage, zu unterscheiden, ob eine Milch unter bezw. bis 30 Minuten auf 70° oder darüber erhitzt worden ist. (Rullmann. Zeitschr. f. Unters. d. Nahr- und Genussmittel 1904, 7, 81.)

Das Alter sowie längeres Aufbewahren der Milch spielt bei der Guajaktinkturreaktion keine Rolle. Die Blaufärbung tritt noch bei sauer gewordener bezw. geronnener Milch ein.

2. ad Schardinger'sche Probe:

Gibt man in einem grossen Reagensglase zu 1 ccm der Schardingerschen Lösung 20 ccm Milch und stellt das Gemisch in ein Wasserbad von 45 bis 50°, so tritt bei roher und schwach erhitzter Milch eine Entfärbung ein, während hoch erhitzte sowie gekochte Milch nach ½ Stunde und länger blau bleibt. Die Schnelligkeit der Entfärbung kann je nach der Art der Ausführung der Reaktion eine verschiedene sein. Man muss sich daher bemühen, möglichst gleichmässig zu verfahren. Man bringt

[1]) Ich habe wesentliche Reaktionsverzögerungen bei mässig pasteurisierter reaktionsfähiger Milch, die sofort auf 15 °C abgekühlt und untersucht wurde, nicht beobachten können. Anm. d. Verf.

zunächst die Farblösung in das Reagensglas, lässt die zu prüfende Milch zufliessen und mischt beide nur durch quirlende Bewegung des Glases. Beim direkten Durchschütteln tritt eine Sauerstoffaufnahme und als Folge davon eine Verzögerung der Reaktion ein. Auch die Temperatur der Milch ist zu beachten. Denn wenn dieselbe eine sehr niedrige ist, vergeht eine längere Zeit, um die Milch auf die Temperatur des Wasserbades zu bringen.

Alle Milchproben, die 20 Minuten auf 70° und darüber erhitzt worden sind, entfärben die Methylenblau-Formalinlösung nicht, auch wenn sie alt sind, gleichgültig ob dieAufbewahrung im Eisschranke oder bei Zimmertemperatur erfolgt ist. Die niedriger erhitzten Milchproben zeigen nach längerer Aufbewahrung gegenüber der frisch erhitzt geprüften Milch ein schnelleres Eintreten der Entfärbung. —

Die Ergebnisse Buttenbergs enthalten somit eine Bestätigung meiner eigenen Beobachtungen, wonach die Schardinger'sche Reaktion, noch mehr aber die Guajakringprobe sehr wohl geeignet sind, rohe oder mässig erhitzte Milch sicher zu erweisen.

Lebenslauf.

Ich, *Bruno Johannes Hugo Herholz*, katholischen Glaubens, bin geboren am 29. November 1878 zu Kossen bei Guttstadt Ostpr. als Sohn des Rittergutspächters Hugo Herholz und seiner Ehefrau Martha, geb. Kuhn. Nach elementarer Vorbildung auf der Knabenschule zu Guttstadt bezog ich das Gymnasium und erhielt am 27. September 1898 von dem Königl. Friedrichskollegium zu Königsberg i. Pr. das Zeugnis der Reife. Hierauf studierte ich Landwirtschaft und besuchte auf den Universitäten Halle, Heidelberg und Königsberg Vorlesungen bezw. Uebungen folgender Herren Dozenten:

In Halle: *Conrad, Dorn, Kühn, Maercker* †, *Volhard.*

In Heidelberg: *Kindermann, Pfitzer* †, *Quincke, Stengel* †.

In Königsberg: *Albert, Backhaus, Braun, Diehl, Gerlach, Gisevius, Gutzeit, Lossen* †, *Luerssen, Lühe, Mügge, Pilz, Schellwien* †, *Stutzer.*

Am 19. September 1904 bestand ich vor der Königl. Prüfungskommission zu Königsberg das Examen für Lehrer der Landwirtschaft an den Landwirtschaftsschulen. Die Versuche zur Dissertation habe ich im Laboratorium des Landw. Instituts zu Königsberg ausgeführt. Das examen rigorosum fand statt am 27. Februar 1908.

Allen meinen akademischen Lehrern, insbesondere den Herren Professoren *Albert* und *Stutzer* für die bei vorliegender Arbeit gewährte Unterstützung, sei noch an dieser Stelle verbindlichst gedankt.

